

**NITROXOLIN ALS INHIBITOR
VON CARBAPENEMASEN
DER METALLO- β -LAKTAMASE-KLASSE**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Anna-Sophia Sonnek (geb. Gunkel)

geboren am 16.02.1990 in Bad Langensalza

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Jena
2. Prof. Dr. Mathias Pletz, Jena
3. Prof. Dr. Florian Wagenlehner, Gießen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 09.01.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
3. Ziele der Arbeit.....	7
4. Theoretische Grundlagen.....	9
4.1 Charakteristik verwendeter Bakterien.....	9
4.1.1 Pseudomonas aeruginosa.....	9
4.1.2 Klebsiella pneumoniae.....	9
4.1.3 Klebsiella oxytoca.....	10
4.1.4 Acinetobacter baumannii.....	10
4.1.5 Proteus mirabilis.....	10
4.1.6 Escherichia coli.....	11
4.1.7 Enterobacter cloacae.....	11
4.2 Charakteristik verwendeter Antibiotika.....	12
4.2.1 Carbapeneme.....	12
4.2.1.1 Grundstruktur der Carbapeneme.....	12
4.2.1.2 Wirkungsweise und Pharmakodynamik.....	13
4.2.1.3 Pharmakokinetik.....	13
4.2.1.4 Wirkstoffe und Indikationen.....	13
4.2.1.5 Nebenwirkungen und Kontraindikationen.....	14
4.2.2 Nitroxolin.....	14
4.2.2.1 Grundstruktur.....	14
4.2.2.2 Wirkungsweise und Pharmakodynamik.....	15
4.2.2.3 Pharmakokinetik.....	15
4.2.2.4 Indikationen.....	16
4.2.2.5 Nebenwirkungen und Kontraindikationen.....	16
4.3 Grundlagen der Antibiotika-Resistenz.....	16
4.3.1 Definition	16
4.3.2 Ursachen der Antibiotika-Resistenz.....	17
4.3.2.1 Natürliche Resistenz.....	17
4.3.2.2 Erworbene Resistenz	18
4.3.2.3 Induzierte Resistenz	18

4.4 Antibiotika-Resistenz durch β -Laktamasen.....	19
4.4.1 Carbapenemasen.....	19
4.4.2 Klassifikation von β -Laktamasen.....	20
4.4.2.1 Klasse A- Carbapenemasen.....	21
4.4.2.2 Klasse B- Carbapenemasen.....	23
4.4.2.3 Klasse D- Carbapenemasen.....	23
5. Materialien und Methodik.....	25
5.1 Modifizierter Hodge-Test.....	25
5.2 PCR.....	26
5.2.1 DNA-Isolation.....	26
5.2.2 Messung des DNA-Gehalts.....	27
5.2.3 16S-rDNA-PCR.....	27
5.2.4 DNA-Aufreinigung nach PCR.....	28
5.2.5 Gel-Elektrophorese.....	29
5.2.6 Sequenz-PCR.....	29
5.2.7 VIM-PCR.....	31
5.3 Agardiffusionstest.....	31
5.3.1 Vergleich von Nitroxolin und EDTA im Agardiffusionstest.....	32
5.4 Checkerboard-Assay.....	33
5.5 MHK-Bestimmung.....	34
5.6 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität.....	35
5.6.1 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität in intakten Zellsuspensionen.....	36
5.6.2 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität in Zell-Lysaten.....	36
5.6.3 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität unter Zugabe von Zink bzw. Nickel.....	38
5.7 Beobachtung der Carbapenemase-Aktivität über 144 Stunden.....	38
5.7.1 Verdünnungsreihe und Bestimmung der Lebendzellzahl.....	39
5.7.2 Herstellen/ Verarbeiten der Lysate.....	40
5.7.3 Bradford-Assay.....	41
5.7.4 Spektrophotometrische Messung und Berechnung der Carbapenemase-Aktivität.....	41
6. Ergebnisse.....	42

6.1 Modifizierter Hodge-Test.....	42
6.1.1 Klebsiella oxytoca VA 023780-1.....	42
6.1.2 Klebsiella pneumoniae UR 38461/2 und UR 38461/3.....	45
6.1.3 Proteus mirabilis VA 026688.....	46
6.2 PCR.....	47
6.2.1 Messung des DNA-Gehalts.....	47
6.2.2 Gel-Elektrophorese nach 16S-rDNA-PCR.....	47
6.2.3 Sequenz-PCR nach 16S-rDNA-PCR.....	48
6.2.4 Gel-Elektrophorese nach VIM-PCR.....	49
6.2.5 Sequenz-PCR nach VIM-PCR.....	50
6.3 Agardiffusionstest.....	51
6.3.1 Klebsiella oxytoca VA 023780/1.....	51
6.3.2 Klebsiella pneumoniae UR 38461/2 und UR 38461/3.....	53
6.3.3 Vergleich von Nitroxolin und EDTA im Agardiffusionstest.....	54
6.4 Checkerboard-Assay.....	55
6.5 MHK-Bestimmung.....	56
6.6 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität.....	57
6.6.1 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität unter Zugabe von Zink bzw. Nickel	62
6.7 Beobachtung der Carbapenemase-Aktivität über 144 Stunden.....	65
6.7.1 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	65
6.7.2 Bradford-Assay.....	66
6.7.3 Spektrophotometrische Messung und Berechnung der Carbapenemase- Aktivität.....	67
7. Diskussion.....	69
8. Schlussfolgerungen.....	79
9. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	81
10. Anhang.....	92
10.1 Abbildungsverzeichnis.....	92
10.2 Tabellenverzeichnis.....	95
10.3 Poster DGHM 2011.....	95
10.4 Lebenslauf.....	97
10.5 Danksagung.....	100
10.6 Ehrenwörtliche Erklärung.....	101

Abkürzungsverzeichnis

A.	Acinetobacter
CA	Carbapenemase-Aktivität
CaNa ₂ EDTA	Calcium disodium ethylenediamine tetraacetic acid
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CPE	Carbapenemase-produzierende Enterobakterien
CPO	Carbapenemase-produzierende Organismen
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.	Escherichia
EB	Elution Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended-Spectrum Beta-Lactamase
FIC	fractional inhibitory concentration
fw-Primer	forward primer
GE	Gel-Elektrophorese
HWI	Harnwegsinfektionen
K.oxy.	Klebsiella oxytoca
K.pneu.	Klebsiella pneumoniae
LCV	Large Colony Variante
MHB	Müller-Hinton-Bouillon
MHT	modifizierter Hodge-Test bzw. Modified Hodge Test
MRE	multiresistente Erreger
NRZ	Nationales Referenzzentrum
PBS	phosphate buffered saline
Ps.aer.	Pseudomonas aeruginosa
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	revolutions per minute
rv-Primer	reverse primer
S.	Serratia
SCV	Small Colony Variante
U	Unit/-s
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 Zusammenfassung

Zunehmende Resistenzen bakterieller Krankheitserreger gegen die aktuell angewendeten Antibiotika stellen in der modernen Medizin ein immer größer werdendes Problem dar. Einige Erreger sind bereits gegen nahezu sämtliche verfügbaren Antibiotika resistent.

Bei Infektionen durch solche multi- bis panresistenten Bakterienstämme ist die Sterblichkeit betroffener Patienten auch bei Ausnutzung aller noch verfügbaren antibiotischen Therapiemöglichkeiten sehr hoch.

Dabei ist die rasch voranschreitende Resistenzentwicklung gegen Carbapeneme, welche als Reserveantibiotika gelten, eine besondere Bedrohung.

Hier spielt die Produktion von Carbapenemasen als Ursache der Carbapenem-Resistenzen eine herausragende Rolle.

In der aktuellen Literatur sind zahlreiche endemische Ausbrüche von Carbapenemase-produzierenden Bakterien beschrieben, wobei diese häufig durch strenge Antibiotic-Stewardship-Programme wieder unter Kontrolle gebracht werden konnten.

Dennoch sind hier die Therapieoptionen bei sich stetig ausbreitenden Resistenzen hochgradig eingeschränkt. Daher sind einerseits Screening-Methoden zur frühzeitigen Erkennung und Therapie von Infektionen durch Carbapenemase-produzierende Bakterien besonders wichtig. Andererseits sollten neben der Suche nach neuen Antibiotika auch alternative Therapiemöglichkeiten entwickelt werden, welche unabhängig von zunehmenden Antibiotika-Resistenzen funktionieren.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Entwicklung einer solchen alternativen Therapiemöglichkeit zur Behandlung von Infektionen durch Bakterien, welche Carbapenemasen der Metallo- β -Laktamase-Klasse produzieren.

Dazu wurde das Vorhandensein von Carbapenemasen in mehreren bakteriellen Isolaten durch den Modifizierten Hodge-Test nachgewiesen und der vorliegende Typ der Carbapenemase mittels PCR detektiert.

Da die Funktion der Metallo- β -Laktamasen von Zink in ihrem aktiven Zentrum abhängig ist, kann diese durch Chelatoren wie EDTA oder Nitroxolin gehemmt werden.

Im Agardiffusionstest konnte daher ein Synergismus zwischen Imipenem als Vertreter der Carbapeneme und Nitroxolin detektiert werden. Durch die Inhibition der hydrolytischen Aktivität der Metallo- β -Laktamasen durch Nitroxolin kann sich die bakterizide Wirkung von Imipenem wieder entfalten.

Dieser Synergismus konnte auch im Checkerboard-Assay für nahezu alle untersuchten Metallo- β -Laktamasen (Carbapenemasen der Klasse B nach Ambler) bestätigt werden.

Mittels spektrophotometrischer Messung konnte eine von der Nitroxolin-Konzentration abhängige hydrolytische Spaltung von Imipenem durch die Metallo- β -Laktamasen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich dieser Effekt deutlicher in intakten Zellsuspensionen als in Zell-Lysaten, was vermutlich auf eine Akkumulation von Nitroxolin in den Zellen zurückzuführen ist. Eine vollständige Hemmung dieser Carbapenemasen wurde bei einer Nitroxolin-Konzentration von 100 bis 150 μ M erreicht. In weiteren spektrophotometrischen Messungen konnte die Inhibition der Metallo- β -Laktamasen durch die Zugabe von freiem Zink wieder aufgehoben werden.

Bei der Untersuchung der Carbapenemase-Aktivität über einen Zeitraum von 144 Stunden zeigte sich durch die synergistische Wirkung von Nitroxolin und Imipenem ein verlangsamtes und abgeschwächtes bakterielles Wachstum bei den untersuchten Metallo- β -Laktamase produzierenden Bakterienstämmen.

Zusammenfassend gewährt die vorliegende Arbeit bei anhaltend problematischer Ausbreitung von Carbapenem-Resistenzen einen Einblick in die Entwicklung einer alternativen Therapieoption für Infektionen durch Metallo- β -Laktamase produzierende Bakterien. Diese besteht aus einer synergistisch wirkenden Kombination aus Nitroxolin und Imipenem.

2 Einleitung

„Die Ausbreitung multiresistenter Erreger (MRE) schreitet rasant voran und erschwert eine erfolgreiche Antibiotikatherapie“ (Pletz et al. 2015: 975). Manche Erreger sind gegen nahezu sämtliche verfügbaren Antibiotika resistent. Da aktuell die Entwicklung neuer Antibiotika nicht zu erwarten ist (Talbot et al. 2006), sind Ausbrüche nicht behandelbarer Infektionen zu befürchten (Spellberg et al. 2008). „Auch bei optimaler therapeutischer Ausnutzung verbliebener Antibiotika-Empfindlichkeiten ist die Sterblichkeit betroffener Patienten hoch“ (Lübbert et al. 11/2013: A2206).

Dies gilt im besonderen Maße für gramnegative Bakterien, welche gegen Antibiotika aus der Klasse der Carbapeneme resistent sind. Carbapeneme gehören zu den atypischen β -Laktam-Antibiotika. Sie haben in dieser Gruppe das breiteste Wirkspektrum und sind β -Laktamase-stabil. Sie zählen deshalb zu den Reserve-Antibiotika, welche ausschließlich bei schweren Infektionen eingesetzt werden sollen (Lüllmann et al. 2006).

Gegen diese Carbapeneme können sich über verschiedene Mechanismen Resistenzen entwickeln, wobei das Augenmerk zunehmend auf durch Carbapenemasen verursachte Resistenzen gerichtet ist (Kaase 2012, Witte und Mielke 2003). Laut Robert Koch-Institut „[...] stellt die weltweite Ausbreitung von Carbapenemasen die derzeit bedrohlichste Resistenzentwicklung [...]“ (Robert Koch-Institut 05/2013: 167) bei den gramnegativen Bakterien dar. Carbapenemasen sind von Bakterien produzierte Enzyme, welche in der Lage sind, Antibiotika aus der Klasse der Carbapeneme aufzuspalten und damit unwirksam zu machen (Kaase 2012, Witte und Mielke 2003).

Das Nationale Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger an der Ruhr-Universität Bochum untersucht seit Mitte 2009 Carbapenem-resistente Bakterienstämme sowie die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen aus ganz Deutschland (Kaase 2012, Lübbert et al. 11/2013). Der seither stetige Zuwachs an Carbapenemase-produzierenden Organismen (CPO) ist in Abbildung eins dargestellt. Hier lässt sich deutlich erkennen, dass in Deutschland OXA-48 die am häufigsten vorkommende Carbapenemase ist, während KPC-2 die zweite und VIM-1 die dritte Stelle besetzt. Einige Carbapenemasen wie NDM-1 spielen in Deutschland aktuell noch keine sehr große Rolle; dennoch lässt sich eine Zunahme in den letzten Jahren verzeichnen (Kaase 2012, Robert Koch-Institut 05/2013). Carbapenemasen fanden sich in den Einsendungen an das NRZ bei etwa 40

Prozent der *Enterobacteriaceae*, bei etwa 20 Prozent der *Pseudomonas aeruginosa* und bei über 90 Prozent der *Acinetobacter baumannii* (Kaase 2012; Lübbert et al. 11/2013).

In Deutschland zeigt sich anhand dieser Verbreitung im Vergleich zu anderen Ländern eine besondere Vielfalt an Carbapenemasen (Robert Koch-Institut 05/2013). Dabei kommt es in einigen Ländern zum endemischen Vorkommen von einzelnen Carbapenemasen.

Beispielsweise kam es in den Jahren 2010 bis 2013 zu einer endemischen Ausbreitung von KPC-2 produzierenden *Klebsiella pneumoniae* in Sachsen. Dabei waren besonders die Intensivstationen des Universitätsklinikums Leipzig betroffen. Hier lag die Mortalitätsrate bei Infektionen mit KPC-2 bei 60 Prozent, was die verheerenden Auswirkungen einer weiteren Ausbreitung von Carbapenemasen ohne die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten nur erahnen lässt (Lübbert 05/2014).

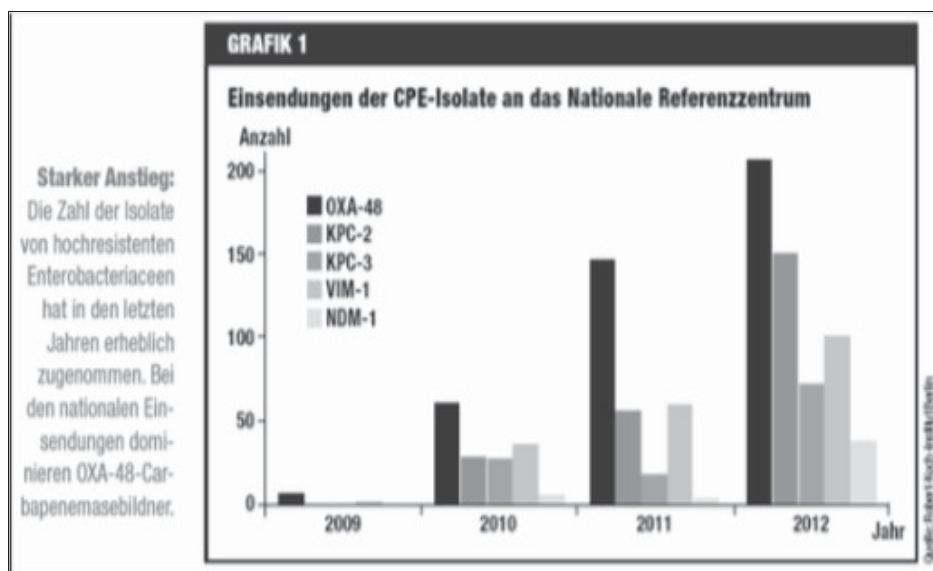


Abb.1: Zunahme der Carbapenemasen (Lübbert et al. 11/2013: A2206)

Dieses Problem besteht wie bereits erwähnt jedoch nicht ausschließlich in Deutschland. In der Abbildung zwei ist die Verbreitung der CPE in ganz Europa als Beispiel für die globale Ausbreitung der CPO zu erkennen. Hier wird in mehreren Zwischenstufen zwischen sporadischem Auftreten wie beispielsweise in den Ländern Luxemburg oder Dänemark bis hin zum endemischen Vorkommen wie in Italien oder Griechenland unterschieden. Während zum Beispiel 2008 in Italien noch ein sporadisches Vorkommen der Metallo- β -Laktamase VIM bei *Enterobacteriaceae* beschrieben wurde, bestand im Jahr 2013 bereits eine weite Verbreitung von KPC-positiven *Klebsiella pneumoniae* (Glasner et al. 02/2013, Grundmann et al. 11/2010).

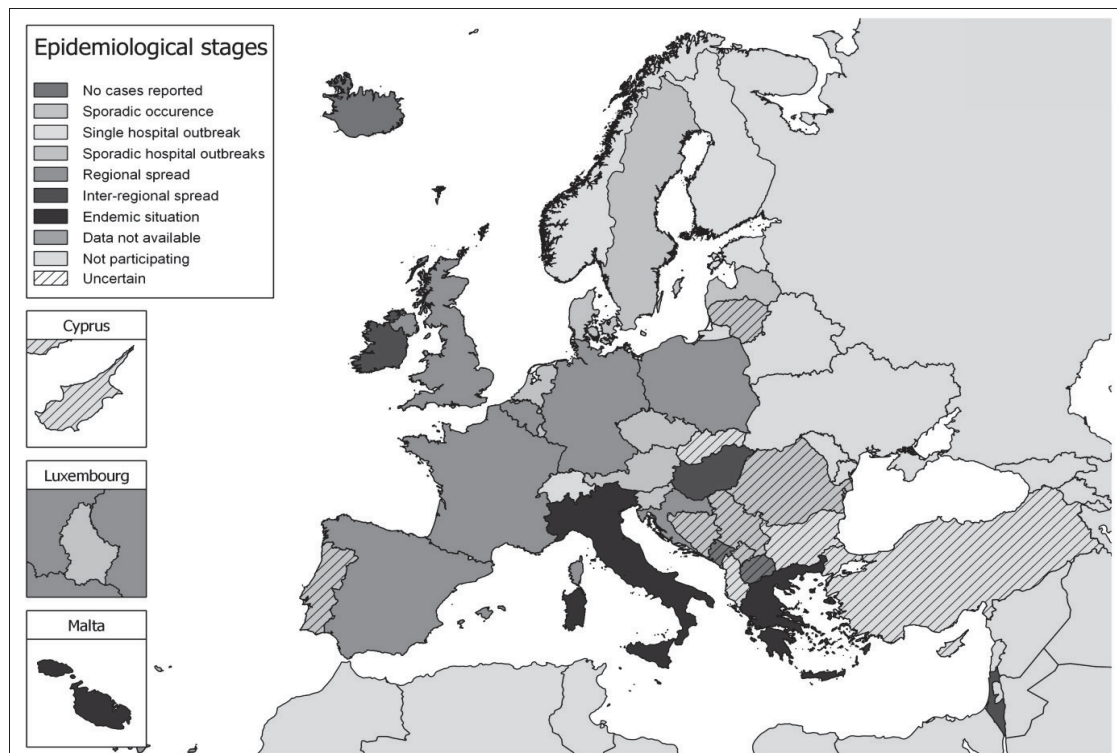


Abb.2: Verbreitung von CPE in Europa (Grundmann et al./ ECDC 2013 - Figure 3 Occurrence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in 38 European countries based on self-assessment by the national experts, March 2013)

Vor dem Hintergrund dieser zunehmenden Verbreitung der CPO ist eine frühzeitige und sichere Detektion für eine adäquate Therapie sowie Maßnahmen zur Verhinderung einer weiteren Ausbreitung unumgänglich, da die Therapieoptionen aktuell deutlich eingeschränkt sind (Nordmann et al. 11/2011).

Dazu sollte ein Screening der Patienten mindestens bei folgenden Risikofaktoren erfolgen: Organ-Transplantation, Therapie mit Carbapenemen und langer Klinikaufenthalt (Aguado Garcia 2015, Yetkin et al. 2015).

Die Therapie bei Infektion oder Verdacht auf eine Infektion durch CPE erfolgt aktuell mittels einer Zweierkombination aus Tigecyclin und Colistin, Tigecyclin und Meropenem oder Tigecyclin und einem Aminoglykosid, da sämtliche in Monotherapie angewendete Antibiotika deutlich höhere Raten an Therapieversagen aufweisen. Eine weitere Möglichkeit ist die Anwendung einer Dreierkombination aus einem Carbapenem, Tigecyclin und Colistin (Tumbarello et al. 2012, Lee & Burgess 2012). Desweiteren werden analog zum Vorgehen bei MRSA Maßnahmen zur Minimierung einer weiteren Ausbreitung der CPO ergriffen. Dazu gehören beispielsweise die Isolierung der Patienten, konsequente Handschuh- und Kittelpflege, hygienische Händedesinfektion sowie die

regelmäßige und kritische Überprüfung des Antibiotika-Regimes (Witte und Mielke 2003).

Im Universitätsklinikum in Palermo (Italien) werden bereits seit 2012 Antibiotic-Stewardship Maßnahmen erfolgreich umgesetzt, um CPE zu reduzieren. Hier wurde u.a. eine Task-Force aus speziell ausgebildetem Pflegepersonal begründet, es erfolgen bei Aufnahme der Patienten in die Klinik Screening-Untersuchungen auf CPE und bei allen neu aufgetretenen Infektionen durch CPE erfolgen epidemiologische Analysen sowie ein Kontakt-Screening (Mularoni et al. 2015).

Auch in Frankreich konnte ein Ausbruch mit Imipenem-resistenten VIM-1 produzierenden *Klebsiella pneumoniae* 2004 mit ähnlichen Maßnahmen unter Kontrolle gebracht werden (Kassis-Chikhani et al. 2010).

Dennoch kann durch diese Maßnahmen die durch CPO verursachte Infektion nicht therapiert werden. Zudem sind auch gegen die aktuell verwendeten Antibiotika wie Tigecyclin und Colistin bereits Resistenzen beschrieben (Yan Sun et al. 02/2013, Bialvaei und Samadi Kafil 04/2015).

Bei einem entsprechend langen Zeitintervall und ausreichend Kontakt mit dem eingesetzten Antibiotikum wird sich eine früher oder später auftretende „[...] Resistenz gegen jeden antimikrobiellen Wirkstoff entwickeln“ (Madigan et al. 2009: 792). Daher ist es notwendig, neben der Entwicklung neuer Antibiotika und der Verbesserung der bereits verwendeten Antibiotika auch alternative Therapiemöglichkeiten bei Infektionen mit CPO zu entwickeln.

3 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer alternativen Therapiemöglichkeit bei Infektionen mit CPO, im Besonderen bei Infektionen durch Bakterien, welche Carbapenemase der Metallo- β -Laktamase-Klasse (Ambler Klasse B) produzieren.

Dazu sollte einerseits das Vorhandensein von Carbapenemase in den vorliegenden bakteriellen Isolaten mittels Hodge-Test nachgewiesen werden. Andererseits bestand die Frage, welche Carbapenemase in dem einzelnen Isolat vorhanden ist, sodass mehrfach PCR-Untersuchungen durchgeführt wurden. Hier wurden die einzelnen Keime sowie die enthaltene Carbapenemase identifiziert.

Die Grundüberlegung bestand darin, dass die Funktion der Metallo- β -Laktamasen von Zink in ihrem aktiven Zentrum abhängig ist. Diese Tatsache wird beispielsweise zur Detektion von Carbapenemase genutzt. Hierzu werden zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemase u.a. in Agardiffusionstests der Synergismus zwischen EDTA und einem Carbapenem beurteilt. Dabei fungiert EDTA als Chelator des Zinkions im aktiven Zentrum der Metallo- β -Laktamase, sodass die hydrolytische Aktivität dieser Carbapenemase inhibiert wird (Miriagou 02/2010).

CaNa_2EDTA , ein synthetisch hergestelltes Derivat von EDTA, wird zum Beispiel auch als Chelator bei Metall-Intoxikationen genutzt. Es hat jedoch zahlreiche Nebenwirkungen wie Nierenversagen, Herzrhythmusstörungen, Knochenmarksdepression oder Hepatotoxizität sowie mehrere Kontraindikationen (Flora und Pachauri 2010). Daher schien es als alternative Therapiemöglichkeit bei Infektionen mit Metallo- β -Laktamase-produzierenden Bakterien eher als ungeeignet.

Ein Antibiotikum, welches als Inhibitor der Carbapenemase-Aktivität bei Metallo- β -Laktamasen eher in Frage kam, war das Nitroxolin. Nitroxolin hat ein recht breites Wirkungsspektrum, wenige Nebenwirkungen und erreicht auch bei peroraler Gabe nach kurzer Zeit seine maximalen Plasmaspiegel. Es hat neben seiner bakteriziden Wirkung außerdem eine Funktion als Chelator von zweiwertigen Kationen wie Zink (siehe auch Kapitel 4.2.2).

Der Einsatz des Nitroxolins als Chelator des Zinkions im aktiven Zentrum von Carbapenemase der Metallo- β -Laktamase-Klasse soll in dieser Arbeit genau betrachtet werden. Dazu wurden verschiedene Methoden angewendet, um die Funktion von

Nitroxolin als Chelator im Vergleich zu EDTA zu untersuchen. Weiterhin soll die synergistische Wirkung von Nitroxolin und Imipenem als Vertreter der Carbapeneme bestätigt sowie der Einfluss dieser synergistischen Wirkung auf das bakterielle Wachstum bei Carbapenemase-produzierenden Bakterienstämmen untersucht werden.

4 Theoretische Grundlagen

4.1 Charakteristik verwendeter Bakterien

In diesem Kapitel werden die wesentlichen Merkmale der in dieser Arbeit verwendeten Bakterien dargestellt.

4.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa gehört zu der Familie der *Pseudomonadaceae* und ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium mit gerader oder leicht gekrümmter Form und polarer Begeißelung. Pseudomonaden können aerob oder anaerob leben und bilden keine Sporen. Sie haben keine besonderen Ansprüche an Nährböden und können ein breites Spektrum an organischen Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Daher eignen sie sich sehr gut für Versuchsreihen (Madigan et al. 2009: 387ff.).

In der Regel kommen Pseudomonaden im Erdboden und im Wasser vor. Dort sind sie für den Abbau vieler löslicher Verbindungen verantwortlich; sie können jedoch auch Xenobiotika wie Pestizide abbauen und sind daher sehr bedeutsam.

Wie viele andere Pseudomonaden ist *Ps.aer.* zudem einer der häufigsten Krankheitserreger, welcher vor allen Dingen im Rahmen von Atemwegs- und Harnwegsinfektionen und massiven Verbrennungen vorkommt. *Ps.aer.* ist ein opportunistischer Erreger, der Infektionen nur bei immungeschwächten Patienten verursachen kann. Dabei erfolgt die Keimübertragung direkt oder indirekt durch Kontakt mit infizierten Personen bzw. infiziertem Material (Madigan et al. 2009: 387ff.).

Problematisch ist dabei die Häufigkeit und Resistenzlage des nosokomialen Erregers. Die natürliche Resistenz gegen viele Antibiotika wird durch das sog. „Resistenzübertragungsplasmid“ (Madigan et al. 2009: 390) verursacht, dessen Gene für Proteine kodieren, die verschiedene Antibiotika außer Kraft setzen können (Madigan et al. 2009, Hof et al. 2005, Schneider 2007).

4.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae gehört zu der Gattung der *Enterobacteriaceae* und ist ein gramnegatives, bekapseltes und stäbchenförmiges Bakterium, welches fakultativ anaerob

lebt (Wöstemeyer 2009).

Am häufigsten verursacht *K.pneu.* Atemwegsinfektionen, besonders Pneumonien und Katheter-assoziierte HWI. Die Übertragung erfolgt dabei über Tröpfcheninfektion oder direkten bzw. indirekten Kontakt zu kontaminierten Personen oder Gegenständen. Die zunehmenden Resistenzen von *K.pneu.* sind zurückzuführen auf das steigende Vorkommen von β -Laktamasen, welche die Erreger unempfindlich gegen Penicillin und Ampicillin machen. Zudem sind diese Klebsiellen zunehmend häufiger resistent gegen Breitspektrum-Antibiotika wie Cephalosporine, da sie zu den ESBL- bildenden Stämmen (ESBL = Extended-Spectrum Beta-Lactamase) zählen (Alexander und Strete 2006, Heesemann 2001, Hof et al. 2005).

4.1.3 Klebsiella oxytoca

Klebsiella oxytoca gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und ist ein gramnegatives, fakultativ anaerob lebendes Stäbchenbakterium. Die häufigsten Infektionen sind im Bereich des Gastrointestinal- und Atemwegstraktes. Die Übertragung erfolgt über direkten bzw. indirekten Kontakt zu kontaminierten Personen oder Gegenständen. Die Resistenzlage von *Klebsiella oxytoca* verhält sich ähnlich wie die von *Klebsiella pneumoniae* (siehe Kapitel 4.1.2, Hof et al. 2005).

4.1.4 Acinetobacter baumannii

Acinetobacter baumannii stammt aus der Familie der *Moraxellaceae* und ist ein gramnegatives, aerobes Stäbchenbakterium. Der nosokomiale Erreger verursacht vor allen Dingen Pneumonien sowie Katheter-assoziierte Harnwegsinfektionen. Die Übertragung erfolgt dabei über kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser. Auch bei diesem Erreger ist eine zunehmende Resistenzentwicklung zu verzeichnen (Seifert 2009).

4.1.5 Proteus mirabilis

Proteus mirabilis gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist ein gramnegatives, meist stäbchenförmiges und fakultativ anaerob lebendes Bakterium. Eine Besonderheit stellt das charakteristische Wachstumsmuster auf festen Nährböden dar, welches durch die als Schwärmen bezeichnete Beweglichkeit der Organismen verursacht wird (Alexander

und Strete 2006).

Wie alle unter Kapitel 4.1 aufgeführten Bakterien gehört auch *Proteus mirabilis* zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen und kann als fakultativ pathogener Keim bei immungeschwächten Personen Harnwegsinfekte, Wundinfektionen sowie Pneumonien hervorrufen. Dabei erfolgt die Übertragung durch direkten oder indirekten Kontakt mit infizierten Personen bzw. Gegenständen. Das gehäufte Vorkommen dieser Infektionen ist vor allen Dingen auf die zunehmende Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterienstämmen in vielen Krankenhäusern zurückzuführen (Alexander und Strete 2006, Heesemann 2001).

4.1.6 Escherichia coli

Escherichia coli stammt aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes, bewegliches Stäbchenbakterium (Wöstemeyer 2009).

Die verschiedenen Unterarten von *E.coli* verursachen entsprechend ihrer Virulenz sowohl intestinale als auch extraintestinale Infektionen wie Katheter-assoziierte Harnwegsinfekte. Die Übertragung der Erreger kann über direkten oder indirekten Kontakt mit kontaminierten Personen bzw. Gegenständen sowie über kontaminiertes Wasser bzw. Lebensmittel erfolgen. Zunehmend treten Ampicillin-resistente Stämme auf. Jedoch ist zu konstatieren, dass auch die Resistenzen gegenüber anderen Antibiotika wie Fluorchinolonen vermehrt auftreten. Zudem treten gehäuft ESBL-bildende Stämme auf, welche die Sensitivität gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation vermindern (Witte und Mielke 2003, Heesemann 2001).

4.1.7 Enterobacter cloacae

Enterobacter cloacae gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist ein gramnegatives, peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium, welches in der Lage ist, Kapseln auszubilden (Hof et al. 2005).

Als fakultativ pathogener Erreger kann *Enterobacter cloacae* eine Bronchitis, Harnwegsinfektion, Meningitis oder seltener auch eine Sepsis verursachen (Hof et al. 2005).

Infektionen durch *Enterobacter cloacae* spielen vor allem bei immunsupprimierten Patienten eine Rolle. Dabei kann der Keim sowohl direkt als auch indirekt über Gegenstände oder Nahrungsmittel übertragen werden (Darai et al. 2009, Seifert 2009).

„Enterobacter spp. spielen eine zunehmende Rolle als Erreger von krankenhauserworbenen Infektionen und sind gefürchtet, da sie eine durch Betalaktamantibiotika induzierbare Breitspektrumbetalaktamase bilden können und dann multiresistent sind“ (Darai et al. 2009: 278).

Natürliche Resistenzen bestehen gegenüber Aminopenicillinen sowie einigen Cephalosporinen (Hof et al. 2009).

4.2 Charakteristik verwendeter Antibiotika

In diesem Kapitel werden die wesentlichen Merkmale der in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika erläutert.

4.2.1 Carbapeneme

Carbapeneme gehören zu den atypischen β -Laktam-Antibiotika, „die verwendet werden können, wenn eine Penicillin-/ Cephalosporin-Resistenz der Keime besteht oder eine Allergie vorliegt“ (Lüllmann et al. 2006: 444). Sie haben unter den β -Laktam-Antibiotika das breiteste Wirkspektrum, sind β -laktamasestabil und daher Reservemittel (Lüllmann et al. 2006).

4.2.1.1 Grundstruktur der Carbapeneme

Carbapeneme besitzen ähnlich den Penicillinen ein Grundgerüst, welches aus einem β -Laktamring und einem Thiazolring besteht. Die Grundstrukturen der häufigsten Carbapeneme sind in den Abbildungen drei bis fünf zu erkennen. Das charakteristische Schwefelatom am Thiazolring der Penicilline ist jedoch durch ein Kohlenstoffatom substituiert. Entsprechend dem Wirkstoff sind zusätzlich verschiedene Substituenten angefügt (Lüllmann et al. 2010).

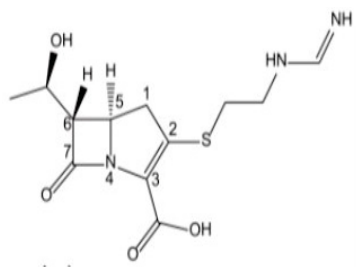


Abb.3: Imipenem

(Ho Jeon et al. 2015: 9655)

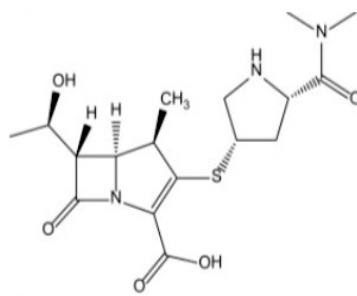


Abb.4: Meropenem

(Ho Jeon et al. 2015: 9655)

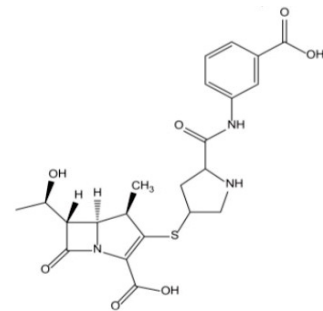


Abb.5: Ertapenem

(Ho Jeon et al. 2015: 9655)

4.2.1.2 Wirkungsweise und Pharmakodynamik

Wie alle β -Laktam-Antibiotika wirken Carbapeneme durch irreversible Inhibition der „Transpeptidasen, die für die Quervernetzung der Peptidoglykanseitenstränge verantwortlich sind“ (Wätzig 2010: 400).

Die bakterizide Wirksamkeit ist zeitlich begrenzt, da ausschließlich in der Zellteilung befindliche Bakterien betroffen sind und der Plasmaspiegel stets die MHK überschreiten muss (Wätzig 2010).

4.2.1.3 Pharmakokinetik

Da Carbapeneme im Magen-Darm-Trakt nicht ausreichend resorbiert werden, erfolgt die Applikation parenteral. Weitere Eigenschaften sind eine gute Verteilung im Gewebe, eine mittelmäßige Liquorgängigkeit sowie die renale Elimination. Damit Imipenem in den Nieren nicht zu schnell abgebaut werden kann, wird es mit Cilastatin, einem Dihydropeptidase-Inhibitor, kombiniert (Wätzig 2010).

4.2.1.4 Wirkstoffe und Indikationen

Zu den wichtigsten Vertretern gehören Imipenem, Meropenem und Ertapenem. Deren chemische Strukturen sind in Abbildung 3 bis 5 zu erkennen. Ihr Wirkungsspektrum umfasst sowohl grampositive und gramnegative Bakterien als auch Anaerobier. Da Carbapeneme als Reserve-Antibiotika gehandhabt werden (siehe oben), beschränkt sich deren Indikation auf nosokomiale „Mischinfektionen und schwere Infektionen (vor dem Erregernachweis), besonders bei Abwehrschwäche“ (Wätzig 2010: 403).

Meropenem kann aufgrund verminderter Neurotoxizität im Vergleich zu Imipenem auch bei bakterieller Meningitis eingesetzt werden (Lüllmann 2006).

4.2.1.5 Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Neben gastrointestinalen und neurologischen Nebenwirkungen können auch allergische Reaktionen oder Störungen der Nierenfunktion auftreten. Dementsprechend ist besonders Ertapenem aufgrund einer verlängerten Eliminationshalbwertszeit bei Niereninsuffizienz kontraindiziert, wie dies in Tabelle eins erkennbar ist. Weiterhin darf bei einer Allergie gegen Carbapeneme keine Anwendung erfolgen; zudem sollte bei Penicillinallergie die Möglichkeit einer Kreuzallergie bedacht werden (Wätzig 2010, Wehling 2005).

Tab.1: „Pharmakokinetische Daten, Handelsnamen und Dosierung der Carbapeneme“

(nach: Tab.17-6 S.801, Roswitha Füssle und Wulf R. Willems in Schmidt 2007)

Wirkstoff	Handelsname (Beispiele)	Proteinbindung (%)	HWZ (min)	Übliche Tages- dosierung (g)
Imipenem	ZIENAM®	20 - 25	60	1,5 - 3 (- 4)
Meropenem	Meronem®	2	60	1,5 - 3
Ertapenem	INVANZ®	> 90	240	1

4.4.2 Nitroxolin

Im folgenden Teil der Arbeit wird etwas näher auf das Antibiotikum Nitroxolin eingegangen. Dabei werden folgende Punkte behandelt: Definition, Grundstruktur, Wirkungsweise, Indikation, Pharmakodynamik und Nebenwirkungen.

„Nitroxolin ist ein Hohlraumchemotherapeutikum mit breitem Wirkspektrum bei HWI-Erregern“ (Vahlensieck jr. 1999: 223).

4.2.2.1 Grundstruktur

Abbildung sechs zeigt die Grundstruktur des Antibiotikums Nitroxolin. Der Wirkstoffname des Nitroxolins lautet 5-nitro-8-hydroxyquinoline (Pelletier et al. 03/1995).

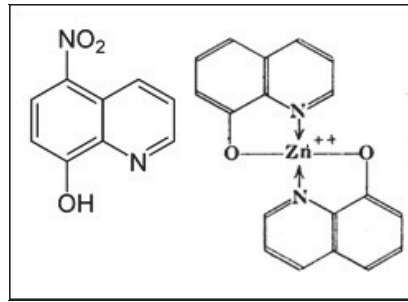


Abb. 6: Nitroxolin: Grundstruktur (links) und Funktion als Chelator (rechts)
(nach Pelletier et al. 03/1995, Holpert und Kramer 1999)

4.2.2.2 Wirkungsweise und Pharmakodynamik

Nitroxolin wirkt gegen die meisten gramnegativen und grampositiven Erreger von HWI sowohl antibakteriell als auch antimykotisch, beispielsweise gegen „humanpathogene Arten der Gattung Candida“ (Fachinfo-Service® Rote Liste 08/2015: 1).

In therapeutisch erreichbaren Konzentrationen wirkt Nitroxolin bakterizid, jedoch erfolgt bereits bei subinhibitorischen Konzentrationen eine Hemmung der bakteriellen Adhäsion. Weiterhin fungiert Nitroxolin als Chelatbildner und kann mit zweiwertigen Kationen Komplexe bilden (siehe auch Abb. 6) (Fachinfo-Service® Rote Liste 08/2015, Holpert und Kramer 1999).

4.2.2.3 Pharmakokinetik

Bei peroraler Gabe erreicht Nitroxolin aufgrund beinahe vollständiger Resorption im Darm nach einer bis eineinhalb Stunden maximale Plasmaspiegel. „Wirksame Serum- oder Gewebespiegel werden nicht nachgewiesen, mit Ausnahme der Prostata,[...]“ (Fachinfo-Service® Rote Liste 08/2015: 2).

Bei überwiegend renaler Elimination werden im Urin nach etwa ein bis zwei Stunden „bakteriologisch aktive Konzentrationen erreicht“ (Fachinfo-Service® Rote Liste 08/2015: 2).

Aus diesem Grund ist jedoch bei höhergradiger Niereninsuffizienz „die klinische Wirksamkeit nicht mehr gewährleistet“ (Fachinfo-Service® Rote Liste 08/2015: 2).

4.2.2.4 Indikationen

Nitroxolin wird zur Therapie von akuten und chronischen Infektionen der ableitenden Harnwege wie beispielsweise einer Urethritis, Zystitis, Ureteritis oder Pyelonephritis entsprechend der Resistenztestung der Bakterien oder Sprosspilze eingesetzt. Überdies kann die Substanz in subinhibitorischen Konzentrationen (siehe oben) zur Infektions- und Rezidivprophylaxe verwendet werden (Fachinfo-Service® Rote Liste 08/2015, Holpert und Kramer 1999).

4.2.2.5 Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Unerwünschte Wirkungen können in Form von gastrointestinalen Beschwerden, allergischen Reaktionen, welche sich meist als vorübergehende Hautreaktionen darstellen, sowie selten allergisch bedingten Blutbildveränderungen auftreten. Nitroxolin ist bei schweren Nieren- oder Leberfunktionsstörungen sowie bei bekannter allergischer Hautreaktion nach Einnahme von Nitroxolin kontraindiziert (Fachinfo-Service® Rote Liste 08/2015, Holpert & Kramer 1999, Vahlensieck 1999).

4.3 Grundlagen der Antibiotika-Resistenz

Im nachfolgenden Teil der Arbeit wird etwas näher auf die Antibiotika-Resistenz eingegangen. Dabei werden folgende Punkte behandelt: Definition, Ursachen der Antibiotika-Resistenz und die Antibiotika-Resistenz durch β -Laktamasen.

4.3.1 Definition

„Eine Bakterienresistenz liegt vor, wenn Bakterien in Anwesenheit therapeutisch relevanter Konzentrationen eines Chemotherapeutikums (Antibiotikums) ihre Vermehrung nicht einstellen. Sie sind gegenüber der Wirksubstanz unempfindlich“ (Hof et al. 2005: 287).

4.3.2 Ursachen der Antibiotika-Resistenz

Im Folgenden werden die Ursachen der Antibiotika-Resistenz näher erläutert.

4.3.2.1 Natürliche Resistenz

„Kein Antibiotikum vermag alle Mikroorganismen zu hemmen oder zu töten und einige Mikroben sind von Natur aus resistent gegen bestimmte Antibiotika“ (Madigan et al. 2009: 786). Dafür gibt es verschiedene Gründe, welche in Tabelle zwei zusammengefasst sind.

Tab. 2: Resistenzmechanismen von Antibiotika (nach Madigan et al. 2009: 786f., Hof et al. 2005: 288)

Mechanismus	Beispiele
Fehlende Zielstruktur im Organismus für das Antibiotikum	Resistenz gegen Penicilline bei Mykoplasmen aufgrund fehlender, für Bakterien typischer Zellwand
Verminderte Permeabilität	Impermeabilität der meisten Gram-negativen Bakterien für Penicillin, u.a. Ps.aer. und Enterobakterien
Inaktivierung des Antibiotikums durch modifizierende Enzyme	- β -Laktamasen, z.B. Penicillinasen oder ESBL bei Enterobakterien - Aminoglykosidasen - Chloramphenicol- Acetyltransferasen
Veränderung der Zielstruktur des Antibiotikums	Wirkung von β -Laktam-Antibiotika wird durch Penicillinbindeprotein verhindert
Veränderung und Weiterentwicklung resistenter Stoffwechselwege	Resistenz gegen Sulfonamide durch veränderten Folsäurestoffwechsel
Aktives Herauspumpen des Antibiotikums aus der Zelle	Tetrazykline / Erythromycin bei einigen Enterobakterien oder Staphylokokken

„In jeder Bakterienpopulation existieren einzelne Individuen, die durch natürliche, zufällige, sehr seltene Mutationen gegen bestimmte Wirkmechanismen von Antibiotika resistent sind. Es besteht dabei kein Zusammenhang mit vorausgegangenen oder bestehenden Therapiemaßnahmen. Diese Persister vermehren sich unter einer Antibiotikatherapie aufgrund ihres Selektionsvorteils und werden dann zum Problem“ (Hof et al. 2005: 288).

4.3.2.2 Erworbene Resistenz

Die erworbene Resistenz, welche auch als sekundäre oder übertragene Resistenz bezeichnet wird, „steht im Zusammenhang mit der Antibiotikatherapie“ (Hof 2014: 304).

Hierbei spielen sowohl der im vorherigen Kapitel beschriebene Selektionsmechanismus als auch die Übertragung von genetischem Material der Bakterien untereinander eine wichtige Rolle.

Die „Resistenzgene“ (Madigan et al. 2009: 787) befinden sich entweder auf Plasmiden und werden dann als „Resistenzplasmide (R-Plasmide)“ (Madigan et al. 2009: 787) bezeichnet, oder seltener auf Chromosomen. Die über Plasmide vermittelte Resistenz leitet sich aus Enzymen ab, welche die Antibiotika inaktivieren oder aus „[...] Faktoren, die die Aufnahme des Wirkstoffs in die Zelle unterbinden oder ihn aktiv herauspumpen (Effluxpumpen)“ (Madigan et al. 2009: 787).

Ein Beispiel hierfür sind die Penicilline, deren Plasmide für β -Laktamasen kodieren. Diese setzen die Antibiotika durch Spaltung des β -Laktam-Ringes außer Kraft. „Über Resistenz-Transfer-Faktoren (Transposons, Plasmide) können primär gegen bestimmte Antibiotika empfindliche Keime sogar Mehrfachresistenzen ausbilden, [...], wenn nebeneinander mehrere Resistenzeigenschaften codiert sind. Solche multiresistenten Keime stellen bei nosokomialen Infektionen in vielen Krankenhäusern ein erhebliches Problem dar“ (Hof 2014: 304).

4.3.2.3 Induzierte Resistenz

„Alle gramnegativen Stäbchenbakterien (außer Salmonella) besitzen zumindest eine chromosomal codierte Information für eine Betalaktamase“ (Hof 2014: 304).

Werden in dieser Situation β -Laktam-Antibiotika bspw. zu niedrig dosiert, „[...] können nach und nach auch bis dahin empfindlich erscheinende Bakterien ohne neue Resistenzgene ihr Verhalten ändern“ (Hof 2014: 304).

Dagegen werden unabhängig von der chromosomalen Regulation plasmidkodierte β -Laktamasen permanent in größeren Mengen produziert (Hof et al. 2005).

4.4 Antibiotika-Resistenz durch β -Laktamasen

Dieser Abschnitt der Arbeit wird einen kurzen Überblick über die β -Laktamasen in Bezug auf die entsprechenden Antibiotika-Resistenzen geben.

Als ersten Punkt gilt es hierbei zu erwähnen, dass die durch β -Laktamasen hervorgerufene enzymatische Inaktivierung von β -Laktam-Antibiotika aus klinischer Sicht einen sehr bedeutsamen Resistenzmechanismus darstellt (Witte und Mielke 2003).

β -Laktamasen sind bakterielle Enzyme. Die für die β -Laktamasen kodierende Gene können sich hierbei sowohl auf dem Plasmid als auch auf dem bakteriellen Chromosom befinden. In Abhängigkeit der jeweiligen Zuordnung befindet sich bei vielen β -Laktamasen ein Serinrest im Aktivzentrum (Bush und Jacoby 2010, Wiegand 2003, Queenan und Bush 2007).

4.4.1 Carbapenemasen

In diesem Kapitel wird etwas näher auf die Carbapenemasen eingegangen. Dabei werden neben Definitionen und Klassifikationen die wichtigsten Enzyme und Bakterien überblicksartig dargestellt.

Carbapenemasen stellen eine sehr vielfältige Familie der β -Laktamasen dar. Desweiteren besitzen sie ein großes Spektrum an β -Laktam-hydrolysierenden Enzymen (Witte und Mielke 2003).

Weiterhin ist zu konstatieren, dass Carbapenemasen in der Lage sind, die Carbapeneme durch hydrolytische Aktivität in ihrer Wirkung aufzuheben. Carbapenemasen werden hierbei zwei bedeutenden molekularen Familien zugeordnet.

Diese Zuordnung ergibt sich auf Grund der unterschiedlichen hydrolytischen Aktivitäten an der sogenannten „active-site“ (Queenan und Bush 2007: 440). Carbapenemasen wurden das erste Mal anhand eines grampositiven stäbchenförmigen Bakteriums beschrieben. Im Vergleich zu anderen damals bekannten β -Laktamasen wurden diese Enzyme durch „EDTA“ (Queenan und Bush 2007: 440) gehemmt, weshalb sie zu den Metalloenzymen gezählt wurden.

In späteren Arbeiten konnte aufgezeigt werden, dass alle Metallocarbapenemasen mindestens ein Zinkatom an der „active-site“ (Queenan und Bush 2007: 440) aufweisen,

welches dazu dient, die Hydrolyse des sogenannten bicyclischen Ringes zu unterstützen.

Gegen Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde eine neue Reihe von Carbapenem-hydrolysierenden Enzymen innerhalb der Gruppe der Enterobakterien entdeckt. Hier wurde jedoch festgestellt, dass EDTA nicht wie bereits bekannt die Aktivität dieser Bakterien hemmt. In weiterführenden Studien konnte aufgezeigt werden, dass diese Enzyme die Aminosäure Serin an ihrer „active-site“ (Queenan und Bush 440) verwenden, welche durch Clavulansäure und Tazobactam inaktiviert wird (Witte und Mielke 2003, Queenan und Bush 2007).

Die Identifikation zahlreicher unterschiedlicher Klassen von Carbapenemasen hat dazu geführt, dass sich die Verbreitungsmuster der Carbapenemasen deutlich verändert haben. Dies wird besonders anhand des nachfolgenden Zitats deutlich: „What was once considered to be a problem of clonal spread has now become a global problem of interspecies dispersion“ (Queenan und Bush 2007: 440).

4.4.2 Klassifikation von β -Laktamasen

In diesem Teil der Arbeit soll etwas näher auf die Klassifikation von β -Laktamasen eingegangen werden.

Diese können sowohl aus funktionaler als auch aus molekularer Sicht klassifiziert werden. Mittels der funktionalen Klassifikation werden die bekannten β -Laktamasen in vier grundlegende Gruppen eingeteilt.

Besonders innerhalb der Gruppe 2 gibt es zahlreiche Untergruppen. Bezüglich dieser funktionalen Klassifikation ist zu erwähnen, dass die Carbapenemasen primär in den Gruppen 2f und 3 wiederzufinden sind (Queenan und Bush 2007).

In Anlehnung an Bush und Jacoby ist zu konstatieren, dass deren funktionale Klassifikation auf drei unterschiedlichen Gruppen beruht. Dazu gehören die Gruppe 1: Cephalosporinasen, Gruppe 2: Serin- β -Laktamasen und Gruppe 3: Metallo- β -Laktamasen (Bush und Jacoby 2010).

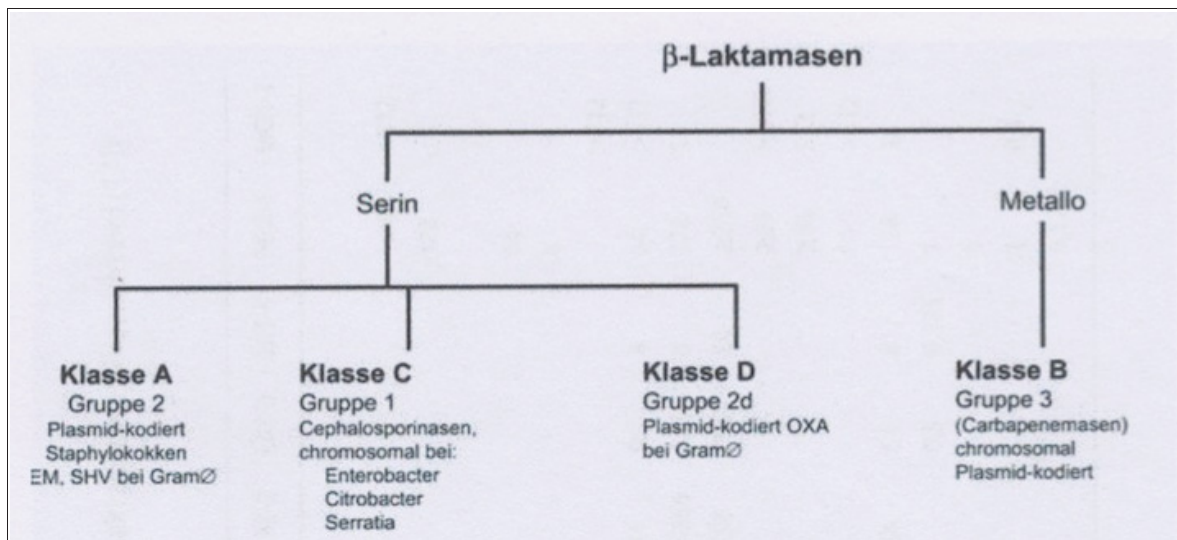


Abb. 7: Molekulare Einordnung β -Laktamasen (Witte und Mielke 2003: 882)

Hinsichtlich der molekularen Klassifikation ist zu erwähnen, dass in Anlehnung an Ambler eine Einteilung in die Klassen A bis D erfolgt. Diese Einteilung lässt sich anhand der Abbildung sieben erkennen, wo die Klassen nach Ambler ihrer jeweiligen β -Laktamase-Klasse zugeordnet sind (Ambler 1980).

β -Laktamasen mit der Aminosäure Serin an ihrer „active site“ (Queenan und Bush 2007: 441) werden den Klassen A, C und D zugeordnet. β -Laktamasen mit mindestens einem Zinkatom an der „active site“ (Queenan und Bush 2007: 441) gehören zu der Klasse B (Ambler 1980, Witte und Mielke 2003).

4.4.2.1 Klasse A- Carbapenemasen

β -Laktamasen der molekularen Klasse A wurden in „*Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, and *Klebsiella* spp.“ (Queenan und Bush 2007: 441) entdeckt. Desweiteren ist zu erwähnen, dass drei bedeutende Familien der Klasse A die folgenden Enzyme beinhalten: NMC/IMI, SME und KPC. Der hydrolytische Mechanismus wird anhand des nachfolgenden Zitats deutlich: „Their hydrolytic mechanism requires an active-site serine at position 70 in the Ambler numbering system for class A β -lactamases“ (Queenan und Bush 2007: 441).

All diesen Enzymen wird die Fähigkeit zugesprochen, zahlreiche β -Laktamasen, wie zum Beispiel die Carbapeneme, Cephalosporine, Penicillin und Aztreonam zu hydrolysieren. Desweiteren ist zu konstatieren, dass die hier genannten Enzyme durch Clavulansäure und

Tazobactam gehemmt werden. Der Vollständigkeit halber ist zu erwähnen, dass auch die GES β -Laktamasen der Klasse A zugeordnet werden. Diese besitzen jedoch nur eine geringe hydrolytische Aktivität (Queenan und Bush 2007).

Die Enzyme SME, NMC und IMI sind chromosomal codierte Enzyme. SME-1 wurde das erste Mal aus *S. marcescens* isoliert. IMI und NMC-A wurden in *E. cloacae* entdeckt und isoliert. Bezugnehmend auf die biochemische Charakterisierung von aufbereiteten SME-, NMC- und IMI- Enzymen ist zu konstatieren, dass alle ein sehr breites hydrolytisches Spektrum aufweisen (Queenan und Bush 2007).

Die im oberen Teil des Abschnittes angesprochenen Enzyme KPC und GES sind plasmid-kodierte Enzyme. KPC- Carbapenemasen weisen hierbei zwei wesentliche Charaktereigenschaften auf, wodurch sie sich von den anderen Enzymen der Gruppe 2f abgrenzen lassen. Dies wird anhand des folgenden Zitats deutlich: „First, the KPC enzymes are found on transferable plasmids; second, their substrate hydrolysis spectrum includes the aminothiazoleoxime cephalosporins, such as cefotaxime“ (Queenan und Bush 2007: 444).

KPC- Carbapenemasen sind überwiegend in dem gramnegativen Stäbchenbakterium *Klebsiella pneumoniae* zu finden sind. KPC bewirkt eine Resistenz der Klebsiellen gegenüber den Carbapenemen (Queenan und Bush 2007).

Das erste Mitglied der KPC-Familie wurde 1996 aus dem Bakterium *Klebsiella pneumoniae* isoliert (Queenan und Bush 2007).

In den Jahren danach entstanden weitere Genotypen (KPC-2 und KPC-3). Innerhalb weniger Jahre verbreiteten sich die KPC-Gene über zahlreiche Kontinente hinweg. KPC- Carbapenemasen hydrolysieren die β -Laktame aller Klassen. Die effizienteste Hydrolyse war bei Ampicillin, Piperacillin, Benzylpenicillin, Nitrocefin, Cefalotin und Cephalexin zu beobachten. Bei den Antibiotika Meropenem, Imipenem, Aztreonam und Cefotaxim war die Hydrolyse deutlich ineffizienter im Vergleich zu Penicillin und Cephalosporin (Queenan und Bush 2007).

Die Familie der KPC weist ein breites Hydrolysespektrum auf, welches sich auch auf die meisten β -Laktam Antibiotika bezieht. Bezugnehmend auf die funktionale Klassifizierung der Gruppe 2f- Carbapenemasen lässt sich in Anlehnung an Queenan und Bush 2007 festhalten, dass die KPC-Familie aufgrund ihrer besonderen Lage auf dem Plasmid das

größte Ausbreitungspotential besitzt. Diese Aussage kann dahingehend unterstützt werden, dass KPC häufig in *K. pneumoniae* vorkommt und dieses gramnegative Stäbchenbakterium die Fähigkeit besitzt, Resistenzen zu transferieren (Queenan und Bush 2007).

4.4.2.2 Klasse B- Carbapenemasen

Die Klasse B- Carbapenemasen oder auch Metallo- β -Laktamasen genannt, können die β -Laktam-Antibiotika vernichten und unwirksam machen.

Metallo- β -Laktamasen sind unter anderem dadurch charakterisiert, dass sich in ihrem aktiven Zentrum ein Metallion befindet. Die meisten Enzyme dieser Klasse sind in der Lage, Cephalosporine und Penicillin zu hydrolysieren. Die Hydrolyse ist hierbei abhängig von der Interaktion des Zinkatoms mit dem β -Laktam an der „active site“ (Queenan und Bush 2007: 445) des entsprechenden Enzyms.

Beispiele für Enzyme der Metallo- β -Laktamasen sind VIM und NDM.

Die am meisten vorkommenden Metallo- β -Laktam-Familien beinhalten VIM-, IMP-, GIM- und SIM- Enzyme.

Bezugnehmend auf die Carbapenemase VIM lässt sich konstatieren, dass VIM-1 das erste Mal in Verona und VIM-2 in Frankreich isoliert wurde. Beide der hier genannten Enzyme wurden in dem gramnegativen Stäbchenbakterium *Pseudomonas aeruginosa* entdeckt. Die Familie der VIM Enzyme beinhaltet insgesamt über 14 verschiedene Mitglieder. Die VIM-2 Metallo- β -Laktamase ist dabei das Enzym, über welches innerhalb der Klasse der Metallo- β -Laktamasen weltweit am meisten berichtet wurde. Es wurde 2006 das erste Mal in China entdeckt. Die hohe Resonanz bezüglich dieses Enzyms ergibt sich aufgrund des weltweit zunehmenden Vorkommens (Queenan und Bush 2007).

4.4.2.3 Klasse D- Carbapenemasen

Die OXA- Carbapenemasen bilden eine bedeutsame Gruppe der plasmidkodierten β -Laktamasen und gehören zur Klasse D der β -Laktamasen.

Die erste OXA- β -Laktamase, die eine Carbapenemase-Aktivität besaß, wurde Mitte der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts von Paton et al beschrieben.

Solche Oxacillinasen kommen typischerweise in *A. baumannii* vor. Im Gegensatz zu dem Enzym KPC kann OXA nicht durch Clavulansäure, Tazobactam oder EDTA inhibiert werden. In Anlehnung an Queenan und Bush 2007 lassen sich aktuell 9 verschiedene Untergruppen der OXA- Carbapenemasen definieren. Enzyme der OXA-Familie sind aus biochemischer Sicht aufgrund einer geringen hydrolytischen Aktivität sehr schwierig zu charakterisieren. Es konnten jedoch hydrolytische Prozesse gegen Penicillin, einige Cephalosporine und Imipenem festgestellt werden (Queenan und Bush 2007, Witte und Mielke 2003).

5 Materialien und Methodik

Im Folgenden werden die angewendeten Methoden sowie die dazu verwendeten Materialien im Einzelnen dargestellt und genau erläutert.

5.1 Modifizierter Hodge-Test

Zum Nachweis des Vorhandenseins von Carbapenemasen wurde der modifizierte Hodge-Test durchgeführt (Tenover 2010, Stratton 2012).

Dazu wurden die folgenden klinischen Isolate aus dem Universitätsklinikum Jena verwendet: *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/2, *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/3 sowie *Proteus mirabilis* VA 026688. Weiterhin stand mit freundlicher Genehmigung von Dr. Y. Pfeifer, Robert Koch-Institut Wernigerode, der Bakterienstamm *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1 zur Verfügung. Als Indikatorstamm wurde *Escherichia coli* ATCC 25922 der Firma *Sigma-Aldrich*, als Positivkontrolle *Acinetobacter baumannii* 34/07 sowie als Negativkontrolle *Escherichia coli* DSM 710806 verwendet.

Zunächst wurden Blutagarplatten mit je einem der in Reinkultur angelegten Bakterienstämme angeimpft und für 18 bis 22 Stunden ohne Kohlenstoffdioxid bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde vom Indikatorstamm das Inokulum hergestellt und die Trübung der entstandenen Suspension auf McFarland-Standard 0,5 eingestellt (Amjad et al. 12/2011).

Um eine optimale Keimdichte in der Bakteriensuspension zu erreichen, wurde diese im Verhältnis 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt (Rodloff 2009).

Von der entstandenen Bakteriensuspension wurden je 100 µl mithilfe eines Drigalski-Glasspatels auf mehreren Müller-Hinton-Agarplatten der Firma *Sigma-Aldrich* gleichmäßig ausgestrichen. Nach drei bis vier Minuten Trocknungszeit wurden auf jede beimpfte Müller-Hinton-Agarplatte mit einer sterilen Pinzette insgesamt zwei Testblättchen der Firma *Bio-Rad* mit einer Wirkstoffkonzentration von 10 µg Imipenem bzw. 10 µg Meropenem aufgebracht und leicht angedrückt (Amjad et al. 12/2011).

Von den zu testenden Bakterienstämmen sowie von der Positiv- und der Negativkontrolle wurden je 3-5 Kolonien mit einer sterilen Metallöse strichförmig zwischen den beiden Antibiotika-Blättchen ausgestrichen (Miller and Gilligan 2012).

Abschließend erfolgte die Inkubation der Agarplatten bei 37 °C ohne Kohlenstoffdioxid für 18 bis 22 Stunden sowie die nachfolgende Auswertung (Amjad et al. 12/2011).

5.2 PCR

Die PCR wurde durchgeführt „zum Nachweis von bakterieller [...] DNA in Patientenproben auf Basis der 16S rDNA [...] - Amplifikation und Sequenzierung, vor allem bei negativen Blutkulturen oder fehlenden kulturellen Nachweisen aus anderen Proben wie Biopsien, Abstrichen, Liquor, Punktaten u.a.“ (Schmidt 02/2009: 1).

Folgende Keime wurden für die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche verwendet: *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/2 (LCV) und UR 38461/3 (SCV) aus dem Universitätsklinikum Jena sowie mit freundlicher Genehmigung von Dr. Y. Pfeifer, Robert Koch-Institut Wernigerode *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1 (normale und Small Colony Variante).

5.2.1 DNA-Isolation

Zuerst erfolgte die DNA-Isolation aus den entsprechenden Reinkulturen der in Kapitel 5.2 genannten Keime unter Verwendung des *High Pure PCR Template Preparation KIT* der Firma Roche.

Jeder Keim wurde in einem Nuklease-freien 1,5 ml Eppendorf-Tube in 200 µl PBS gelöst und anschließend für fünf Minuten bei einer Frequenz von 10000 rcf in der *Hettich* Kühltzentrifuge zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 200 µl PBS resuspendiert und der Überstand verworfen. Zu jeder Suspension wurden 5 µl Lysozym (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCL, pH 8,0) zugegeben, im *VELP Scientifica* Vortexmixer gemischt und für 15 Minuten bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurden je 200 µl *Binding Buffer* sowie 40 µl Proteinase K dazu pipettiert und jeweils gevortext. Die Lösungen wurden für 20 Minuten bei einer Temperatur von 50 °C inkubiert, erneut im Vortexer vermischt und dann für 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

Nun wurden 100 µl Isopropanol hinzugegeben und gevortext.

Die Flüssigkeiten aus jedem Eppendorf-Tube wurden in je ein Collection-Tube mit innen

liegendem High Filter-Tube pipettiert und für eine Minute bei einer Frequenz von 14100 rcf zentrifugiert. Die High Filter-Tubes wurden in neue Collection-Tubes gesetzt. In jedes High Filter-Tube wurden 500 µl *Inhibitor Removal Buffer* pipettiert und die Suspensionen für eine Minute bei 14100 rcf zentrifugiert.

Die High Filter-Tubes wurden erneut in neue Collection-Tubes gesetzt, je 500 µl *Wash Buffer* dazu pipettiert und für eine Minute bei 14100 rcf zentrifugiert. Der zuletzt genannte Schritt wurde wiederholt, die Collection-Tubes verworfen und die High Filter-Tubes in Nuklease-freie 1,5 ml Eppendorf-Tubes gesetzt. Es wurden jeweils 30 µl eines zuvor auf 70°C erhitzten *Elution Buffer* in die High Filter-Tubes pipettiert und die Lösungen für eine Minute bei 14100 rcf zentrifugiert. Zuletzt wurde die in den Eppendorf-Tubes isolierte DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

5.2.2 Messung des DNA-Gehalts

Ziel der Messung des DNA-Gehalts ist, „nach abgeschlossener DNA-Isolierung die Konzentration und die Reinheit der DNA-Probe“ (Schmidt 02/2009: 12) zu bestimmen.

Dazu wurden jeweils 5 µl der wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben hergestellten Proben auf den Messpunkt des Nano Drop Spektrophotometers pipettiert und die DNA-Konzentration abgelesen.

5.2.3 16S-rDNA-PCR

„Zum Nachweis von bakterieller DNA werden zwei parallele PCR-Reaktionen angesetzt, in welchen [...] Gram-negative Bakterien (PCR A) [...] nachgewiesen werden“ (Schmidt 02/2009: 14).

Unter Verwendung des Kits der Firma *MBI Fermentas* wurde ein Mastermix für insgesamt 5 Proben hergestellt (vier Keime siehe Kapitel 5.2 und eine Negativkontrolle). Der Mastermix-Ansatz setzt sich zusammen wie in Tabelle drei dargestellt.

Tab. 3: Mastermix-Ansatz für 5 Proben (nach Schmidt 02/2009: 15)

MgCl ₂	32,5 µl
dNTP	32,5 µl
10x Puffer	32,5 µl
Taq-Polymerase	6,5 µl
Primer 16Sneu fw (10pmol; 5'-Tgg TA _g TCC AC _g CC _g TAA AC _g -3')	6,5 µl
Primer 16Sgr- rv (10 pmol; 5'-CgT AAg ggC CAT gAT gAC T-3')	6,5 µl
DEPC-Wasser	182 µl

Der Mastermix-Ansatz wurde gevortext und für fünf bis zehn Sekunden bei einer Frequenz von 14100 rcf anzentrifugiert. In PCR-Röhrchen wurden jeweils 21 µl Mastermix vorgelegt und 4 µl jeder Probe bzw. einmal 4 µl DEPC-Wasser der Firma *Roth* für die Negativkontrolle dazugegeben. Die Tubes wurden kurz anzentrifugiert und anschließend die PCR-Reaktion mit gespeichertem Programm *PCR 16S* für etwa zwei Stunden im *Mastercycler ep gradient S* durchgeführt.

5.2.4 DNA-Aufreinigung nach PCR

Nach der 16S-rDNA-PCR wurde eine DNA-Aufreinigung zur Befreiung von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen mithilfe des *QIAquick PCR Purification KIT* der Firma *Qiagen* durchgeführt.

Zunächst wurden in jede der vier Proben je 125 µl *Buffer PBI* hinzugegeben. Das Gemisch wurde aus den Eppendorf-Tubes in *QIAquick spin columns* pipettiert, welche in 2 ml Collection-Tubes platziert wurden und für 60 Sekunden bei einer Frequenz von 14100 rcf zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand aus den Collection-Tubes wurde verworfen und die *QIAquick spin columns* in die Collection-Tubes zurückgesetzt.

Zu jeder Probe wurden 750 µl *Buffer PE* dazugegeben und die Lösung bei 14100 rcf für 60 Sekunden zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde verworfen und der zuletzt genannte Schritt wiederholt.

Der Flüssigkeitsüberstand wurde erneut verworfen und die Filter-Tubes in neuen Eppendorf-Tubes platziert. Zu jeder Probe wurden 30 µl *Buffer EB* pipettiert und das

Gemisch für eine Minute ruhen gelassen. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 60 Sekunden bei 14100 rcf wurden die Filter-Tubes verworfen, sodass die gereinigten Proben in den Eppendorf-Tubes verblieben sind (Qiagen 11/2006).

5.2.5 Gel-Elektrophorese

„Ein sehr nützliches Verfahren für die Auftrennung oder Reinigung von DNA-Fragmenten ist die Gelelektrophorese“ (Sadava et al. 2011: 419).

Zunächst wurde ein zweiprozentiges Agarosegel der Firma *Biozym* in die GE-Kammer gegeben und als Laufpuffer 1x TAE-Puffer der Firma *Roth* (2 M Tris, 1 M Essigsäure und 50 mM EDTA in destilliertem, deionisiertem Wasser; pH 8,5) dazupipettiert (Schmidt 02/2009).

Anschließend wurden auf einem Parafilm-Streifen jeweils 5 µl DNA-Ladepuffer der Firma *Roth* mit je 10 µl der Proben bzw. der Negativkontrolle gemischt und die Flüssigkeiten in folgender Reihenfolge in die Taschen des Gels pipettiert: 1: K.oxy. VA 023780/1 (LCV), 2: K.pneu. UR 38461/2 (LCV), 3: K.pneu. UR 38461/3 (SCV), 4: K.oxy. VA 0233780/1 (SCV), 5: Negativkontrolle. In die sechste Tasche wurden 2,7 µl pGEM-Marker der Firma *Promega* hinzu pipettiert. Die GE-Kammer wurde mit einem Deckel verschlossen und die Elektrophorese unter folgenden Bedingungen laufen gelassen: 120 Volt, 250 mA, 40 Minuten.

Es erfolgte die Inkubation des Gels über zehn Minuten in Ethidiumbromidfärbelösung. Im Anschluss wurde das Gel für 20 Minuten in Wasser entfärbt und das Bild unter Verwendung des *Image-Master VDS* dokumentiert (Schmidt 02/2009).

Zuletzt erfolgte die DNA-Extraktion aus dem Agarosegelblock, um die nachfolgende Sequenzierung zu ermöglichen. Dazu wurden die DNA-Banden mithilfe des *UV-Imagers* mit einem Einwegskalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte nach Anleitung des *Agarose-Gelextraktionskit-Jena-Bioscience*. Die Banden wurden mit 30 µl DEPC-Wasser der Firma *Roth* eluiert (Schmidt 02/2009, Richter 2003, Dechert 2012).

5.2.6 Sequenz-PCR

„Durch die DNA-Sequenzierung kann die Abfolge der DNA-Basen bestimmt und somit

eine Sequenzvariation nachgewiesen werden“ (Holinski-Feder E. 2011: 106).

Als erstes wurden vier Eppendorf-Tubes mit jeweils 9 µl DEPC-Wasser und 1 µl der entsprechenden Probe befüllt und für wenige Sekunden bei 12000 rpm anzentrifugiert.

Danach wurde für jede Probe der in Tabelle vier dargestellte PCR-Ansatz unter Verwendung des *DYEnamic-ET-Terminator Sequencing Kit* von *GE-Healthcare* hergestellt und in 0,2 ml Tubes mit Flachdeckel der Firma *Biozym* gefüllt, je einmal mit fw-Primer und einmal mit rv-Primer.

Tab. 4: Cycle-Sequenz-PCR-Ansatz (nach Schmidt 02/2009: 21)

DNA-Template (Probe)	5 µl
DYEnamic ET Terminator Reaktionsmix	4 µl
Primer fw bzw. rv	1 µl

Alle acht Proben wurden anzentrifugiert und anschließend wurde im *Eppendorf Mastercycler ep gradient S* das unter Tabelle fünf aufgeführte Programm durchgeführt.

Tab. 5: Programm etcycle im *Eppendorf Mastercycler ep gradient S* (nach Schmidt 02/2009:22)

94°C	50°C	60°C	4°C
20 sec	15 sec	60 sec	∞
25x			

Im Anschluss wurden acht Sample Collection-Tubes entsprechend des *Centri-Sep Columns Protocol* von *Princeton Separations* vorbereitet und bei 25 °C und 750 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Die fertigen Proben wurden nach der in Tabelle 5 aufgeführten Cycle-Sequenz in die präparierten Sample Collection-Tubes, welche in neue Eppendorf-Tubes platziert wurden, pipettiert und wiederholt mit dem zuvor genannten Programm zentrifugiert. Die Sample Collection-Tubes wurden verworfen und die in den Eppendorf-Tubes verbleibenden Proben jeweils in die Vertiefungen A bis H einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zuletzt erfolgte die Analyse der Sequenz-Reaktionsansätze mithilfe des *ABI Prism 3130* sowie die Auswertung der Sequenz mit *Sepsitest™ BLAST, Version 0.9* (Schmidt 02/2009).

5.2.7 VIM-PCR

Mit den isolierten DNA-Templates (siehe 5.2.1) wurde mithilfe des *Multiplex PCR Kit* der Firma *Qiagen* nach dazugehörigem Protokoll ein weiterer Reaktionsansatz für vier Proben und eine Negativkontrolle hergestellt, dessen Zusammensetzung in Tabelle sechs aufgeführt ist.

Tab. 6: PCR-Ansatz für VIM-PCR (nach Schmidt 02/2009)

Mastermix	62,5 µl
Fw-Primer	5 µl
Rv-Primer	5 µl
DEPC-Wasser	40 µl

Vom Reaktionsansatz wurden je 22,5 µl und 2,5 µl des jeweiligen DNA-Templates bzw. 2,5 µl gereinigtes Wasser für die Negativkontrolle in ein 0,2 ml Eppendorf-Tube pipettiert. Anschließend wurde für die präparierten PCR-Ansätze im *Mastercycler® pro* der Firma *Eppendorf* das unter Tabelle sieben aufgeführte Programm durchgeführt.

Tab. 7: VIM-PCR-Protokoll *Mastercycler® pro* (nach Schmidt 02/2009)

95 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
15 min	30 sec	30 sec	40 sec	10 min	∞
	45 x				

Im Anschluss wurden die DNA-Aufreinigung und die Gelelektrophorese analog zu den in Kapitel 5.2.4 und 5.2.5 dargestellten Abläufen durchgeführt.

Weiterhin wurde die Sequenz-PCR analog zu dem in Kapitel 5.2.6 beschriebenen Ablauf durchgeführt. Hierbei wurden allerdings nur 2 µl DNA-Template verwendet und zusätzlich 3 µl DEPC-Wasser zum Reaktionsansatz hinzu pipettiert. Die Analyse der Sequenz-Reaktionsansätze erfolgte mithilfe des *ABI Prism 3130*. Die Auswertung der Sequenz wurde durch *Jena Bioscience* durchgeführt (Poirel et al. 05/2011).

5.3 Agardiffusionstest

Zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von Imipenem als Vertreter der Carbapeneme wurde u.a. der sog. Agardiffusionstest durchgeführt.

Hierzu wurden Blutagarplatten mit einem der in Reinkultur angelegten Bakterienstämme angeimpft und für 18 bis 22 Stunden ohne Kohlenstoffdioxid bei 37 °C inkubiert.

Folgende Bakterienstämme standen hierzu mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Y. Pfeifer, Robert Koch-Institut Wernigerode zur Verfügung: *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1, *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/2 sowie *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/3. Zusätzlich wurde als Kontrolle *Escherichia coli* ATCC 25922 der Firma *Sigma-Aldrich* verwendet.

Anschließend wurde „durch Abnahme und Suspendieren von 4-5 Kolonien in 2-5 ml gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung aus einer frischen Reinkultur (Vorkultur)“ (Rodloff 2009: 263) das Inokulum hergestellt und die Trübung der entstandenen Suspension auf McFarland-Standard 0,5 eingestellt. Um „eine Keimdichte von $1\text{-}5 \times 10^6$ KBE/ml“ (Rodloff 2009: 263) in der jeweiligen Bakteriensuspension zu erreichen, wurde diese im Verhältnis 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Von dieser Lösung wurden jeweils 100 µl mithilfe eines Drigalski-Glasspatels auf einer Müller-Hinton-Agarplatte der Firma *Sigma-Aldrich* gleichmäßig ausgestrichen.

Nach drei bis vier Minuten Trocknungszeit wurden auf jede beimpfte Müller-Hinton-Agarplatte mit einer sterilen Pinzette drei Testblättchen der Firma *Bio-Rad* mit einer Wirkstoffkonzentration von je 10 µg Imipenem in gleichmäßigen Abständen aufgebracht und leicht angedrückt, wobei auf eines der drei Testblättchen vorher 4 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung aufgebracht wurden.

Abschließend erfolgte die Inkubation der Agarplatten bei 37 °C ohne Kohlenstoffdioxid für 18 bis 22 Stunden sowie die nachfolgende Auswertung entsprechend der CLSI-Empfehlungen (Rodloff 2009, Süßmuth 1999, Alexander und Strete 2006, Hof et al. 2005, Patel et al. 01/2014).

5.3.1 Vergleich von Nitroxolin und EDTA im Agardiffusionstest

Da die Metallo-β-Laktamasen in ihrem aktiven Zentrum Zink als Cofaktor aufweisen (siehe auch Kapitel 4.4.2.2), können Chelatoren wie EDTA ihre Aktivität hemmen (siehe auch Kapitel 10.3, Flora und Pachauri 2010).

Für diesen Versuch wurden folgende Bakterienstämme mit freundlicher Genehmigung von Dr. Yvonne Pfeifer, Robert Koch-Institut Wernigerode verwendet: *Escherichia coli* 2/10,

Klebsiella oxytoca 57/07 sowie *Klebsiella pneumoniae* 93/08.

Analog zu dem in Kapitel 5.3 beschriebenen Vorgehen wurden die Blutagarplatten vorbereitet und mit drei Testblättchen der Firma *Bio-Rad* mit einer Wirkstoffkonzentration von je 10 µg Imipenem in gleichmäßigen Abständen bestückt.

Dabei wurden auf jeweils ein Testblättchen 750 µg EDTA bzw. Nitroxolin aufgebracht. Anschließend erfolgte die Inkubation der Agarplatten bei 37 °C für 18 bis 22 Stunden und die in Kapitel 6.3.3 beschriebene Auswertung.

5.4 Checkerboard-Assay

Diese auch als Schachbrett-Titration bezeichnete Methode ist eine “[...] Untersuchung des Einflusses eines Kombinationspartners auf die minimale Hemmkonzentration des anderen“ (Süßmuth et al. 1999: 198).

Die Ergebnisse des Checkerboard-Assays wurden mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. med. Astrid Sobke zur Verfügung gestellt.

Mithilfe des Checkerboard-Assays konnte die Interaktion zwischen Imipenem und Nitroxolin abgeschätzt werden (siehe auch Kapitel 10.3).

Dazu wurde auf einer 96-well-Mikrotiterplatte Imipenem in einer steigenden Konzentration von 0,125 µg/ ml bis 128 µg/ ml auf der X-Achse und Nitroxolin in steigender Konzentration von 2 µg/ ml bis 128 µg/ ml auf der Y-Achse aufgetragen, mit dem jeweiligen Bakterienstamm beimpft und inkubiert.

Es wurden insgesamt 18 Bakterienstämme untersucht, welche mit Ausnahme von UR 11710/10 aus dem Universitätsklinikum Jena mit freundlicher Genehmigung von Dr. Yvonne Pfeifer, Robert Koch-Institut Wernigerode zur Verfügung gestellt wurden.

Nach Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen wurde der FIC-Index entsprechend der in Abbildung acht dargestellten Formel berechnet, wobei X und Y den jeweiligen Konzentrationen an der Wachstumsgrenze entsprechen (Süßmuth et al. 1999).

„Zur Beurteilung der Interaktion wird die Konzentration jeder Einzelsubstanz in der Kombination dividiert durch die Konzentration, bei der man mit der Einzelsubstanz die gleiche Wirkung erzielt“ (Süßmuth et al. 1999: 199).

Diese *fractional inhibitory concentration* „[...] wird zu dem FIC-Wert der anderen

Substanz für das betrachtete Konzentrationsverhältnis addiert. Diese Summe gibt als FIC-Index eine quantitative Größe, die die Art des Zusammenwirkens beschreibt“ (Süßmuth et al. 1999: 199).

Alle Assays wurden entsprechend der CLSI-Empfehlungen von 2014 durchgeführt und ausgewertet (Orhan et al. 01/2005, Sopirala et al. 11/2010, Vishwanatha et al. 2011).

$\begin{aligned} \text{FIC Index} &= \text{FIC Imipenem} + \text{FIC Nitroxolin} \\ &= \frac{\text{X (Imipenem)}}{\text{MIC (Imipenem)}} + \frac{\text{Y (Nitroxolin)}}{\text{MIC (Nitroxolin)}} \end{aligned}$

Abb. 8: Berechnung des FIC-Index (eigene Darstellung)

5.5 MHK-Bestimmung

„Zur Auswahl einer geeigneten Therapie bakterieller Infektionen muss man die Empfindlichkeit der Erreger gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen kennen“ (Ziesing et al. 2012: 144).

„Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration ist das älteste Verfahren zur Empfindlichkeitsprüfung“ (Ziesing et al. 2012: 144).

Für diesen Versuch wurden folgende Bakterienstämme aus dem Universitätsklinikum Jena verwendet: *Pseudomonas aeruginosa* UR 11710/10 sowie *Klebsiella pneumoniae* UR 11710/10. Eine Blutagarplatte wurde mit jeweils einem der genannten Keime beimpft und über 18 bis 22 Stunden bei einer Temperatur von 37°C im *Steri-Cycle CO₂-Inkubator* inkubiert.

Anschließend wurden zwei 96-Well-Mikrotiterplatten (siehe Abb. 9) wie nachfolgend beschrieben vorbereitet. In einem Greiner-Röhrchen wurden 992,3 µl Müller-Hinton-Bouillon mit 7,68 µl Nitroxolin einer Stocklösung von 500 µM gemischt und davon je 200 µl in die Kavitäten 12 A und 12 B pipettiert.

Für die Kavitäten 12 C und 12 D wurden 75 µl einer 20 µM Stocklösung mit 925 µl Müller-Hinton-Bouillon gemischt und davon je 200 µl in die genannten Kavitäten pipettiert. In einem dritten Greiner-Röhrchen wurden 3,84 µl einer 500 µM Nitroxolin-Stocklösung und 7,5 µl einer 20 µM Zink-Stocklösung in 988 µl MHB gelöst und davon jeweils 200 µl in die Kavitäten 12 E und 12 F gegeben.

Danach wurden mit einer Multipipette der Firma *Eppendorf* je 100 µl der MHB in die erste bis elfte Kavität der Zeilen A bis F pipettiert.

Im Anschluss wurden mit der Multipipette jeweils 100 µl aus der zwölften in die elfte, aus der elften in die zehnte, aus der zehnten in die neunte Kavität pipettiert usw. bis zur zweiten Kavität.

Von den beimpften und inkubierten Blutagarplatten wurden jeweils drei bis fünf Kolonien in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und ein McFarland-Standard von 0,5 eingestellt. Von jedem der beiden Keime wurden 60 µl dieser Lösung in 3 ml MHB in ein Greiner-Röhrchen hinzugegeben und auf dem Vortexer vermischt.

Anschließend wurden je 50 µl der entstandenen Bakteriensuspensionen in die jeweils zweite bis elfte Kavität der zugehörigen 96-Well-Mikrotiterplatte zugegeben. Beide Mikrotiterplatten wurden für 18 bis 20 Stunden bei einer Temperatur von 37°C in einem geschlossenen Behälter inkubiert und im Anschluss ausgewertet (Süßmuth et al. 1999, Hof 2014, Ziesing et al. 2012).

A												
B												
C												
D												
F												
G												
H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Abb. 9: 96-Well-Mikrotiterplatte (eigene Darstellung)

5.6 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität

Zur Messung des Wachstums verschiedener Bakterienpopulationen unter dem Einfluss von Imipenem als Vertreter der Carbapeneme sowie Nitroxolin wurde eine Trübungsmessung mittels Spektrophotometer durchgeführt.

Für diesen Versuch wurden folgende Bakterienstämme verwendet: *Pseudomonas aeruginosa* UR 11710/2-10 aus dem Universitätsklinikum Jena. Weiterhin standen folgende Bakterienpopulationen mit freundlicher Genehmigung von Dr. Y. Pfeifer, Robert

Koch-Institut Wernigerode zur Verfügung: *Pseudomonas aeruginosa* 48/09, *Klebsiella oxytoca* 05/08, *Klebsiella pneumoniae* 404/08 und *Enterobacter cloacae* 135/09.

5.6.1 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität in intakten Zellsuspensionen

Zunächst wurden 100 ml Müller-Hinton-Bouillon mit der jeweiligen Bakterienpopulation angeimpft und über 18 bis 22 Stunden bei 37 °C auf einer Schüttelmaschine inkubiert.

Anschließend wurden die Proben nach Entnahme in Eppendorf-Tubes kurzzeitig in einem Eisbad gekühlt. Im auf 37 °C angewärmten Photometer wurde die für Imipenem geeignete Wellenlänge von 298 nm eingestellt (Verdier et al. 10/2011).

Für die Kontrolle wurde eine rechteckige Standard-Quarzküvette im Spektrophotometer vorgewärmt und mit 1 ml PBS, welches zuvor im Wasserbad auf 37 °C erhitzt wurde, in den Probenraum eingebracht. Zuerst erfolgte die Messung dieser Referenzküvette. Unter Zugabe von 25 µl Imipenem von einer Imipenem-Stocklösung mit 2 mg/ml wurde der zweite Messwert abgenommen. Nun erfolgte die Zugabe von 2 µl einer mit PBS 1:10 verdünnten Zellsuspension der jeweiligen Bakterienpopulation in die Quarzküvette mit Messung des Ausgangswertes. Über eine Periode von einer Stunde wurde im Abstand von jeweils fünf Minuten die Extinktion abgelesen und in den in Kapitel 6.6 dargestellten Diagrammen aufgetragen (Bast 1999).

Ein analoges Vorgehen wurde für die Messung mit Nitroxolin angewendet. Hier wurde zunächst 1 ml Nitroxolin mit folgenden Konzentrationen jeweils einzeln in die vorgewärmte Quarzküvette appliziert: 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM und ein Referenzwert erhoben. Anschließend erfolgte wie oben beschrieben die Zugabe von Imipenem sowie die Zugabe der intakten Zellsuspension mit folgender Messung der Extinktionen über den Zeitraum von einer Stunde. Sämtliche Werte wurden in den in Kapitel 6.6 dargestellten Diagrammen aufgetragen.

5.6.2 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität in Zell-Lysaten

Zu Anfang wurden 100 ml Müller-Hinton-Bouillon mit der jeweiligen Bakterienpopulation

angeimpft und über 18 bis 22 Stunden bei 37 °C auf einer Schüttelmaschine inkubiert.

Im Anschluss wurde die Probe zu gleichen Teilen in zwei 50 ml Zentrifugen-Röhrchen abgefüllt und in einer Kühlzentrifuge bei einer Temperatur von 4 °C und einer Frequenz von 11000 rpm über 15 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde aus beiden Zentrifugen-Röhrchen vorsichtig vollständig abpipettiert und verworfen. Die verbleibenden Pellets wurden in jeweils 2 ml PBS aufgelöst und im Kühlschrank bei 8 °C kurzzeitig zwischengekühlt.

Danach erfolgte der Zellaufschluss im Ultraschallgerät für insgesamt fünf mal 20 Sekunden mit jeweils zwei Minuten Zwischenkühlung im Eisbad. Dabei wurden am Ultraschallgerät folgende Einstellungen vorgenommen: *Output 80, Output control 8, Timer Stufe 4, Duty Cycle 90 %*.

Jeweils 1 ml der gewonnenen Lysate wurden in zwei Eppendorf-Tubes gefüllt und in einer Mikrozentrifuge erneut bei einer Temperatur von 4 °C und einer Frequenz von 13200 rpm über 15 Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurden beide Überstände in einem Eppendorf-Tube zusammengefügt, im Eisbad kurzzeitig gekühlt und die Überstände verworfen. Nun erfolgte die Trübungsmessung analog zu der in Kapitel 5.6.1 beschriebenen spektrophotometrischen Messung. Die für Imipenem geeignete Wellenlänge von 298 nm (Verdier et al. 10/2011) wurde im auf 37 °C angewärmten Photometer eingestellt.

Für die Messung des Referenzwertes wurde eine rechteckige Standard-Quarzküvette im Spektrophotometer vorgewärmt und mit 1 ml PBS, welches zuvor im Wasserbad auf 37 °C erhitzt wurde, in den Probenraum eingebracht. Unter Zugabe von 25 µl Imipenem von einer Imipenem-Stocklösung mit 2 mg/ml wurde der zweite Messwert abgenommen.

Danach wurde 1 µl eines mit PBS 1:10 verdünnten Zell-Lysates der jeweiligen Bakterienpopulation in die Quarzküvette hinzugegeben und der Ausgangswert gemessen. Über eine Periode von einer Stunde wurde im Abstand von jeweils fünf Minuten die Extinktion abgelesen und in den in Kapitel 6.6 dargestellten Diagrammen aufgetragen. Analog wurde bei den Messungen mit Nitroxolin vorgegangen (siehe auch Kapitel 5.6.1) (Bast 1999).

5.6.3 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität unter Zugabe von Zink bzw. Nickel

Die Herstellung der Zell-Lysate erfolgte analog zu dem in Kapitel 5.6.2 beschriebenen Vorgehen. Dabei erfolgte jeweils eine Messung der Kontrolle, unter Zugabe von 100 μM Nitroxolin, unter Zugabe von 100 μM Nitroxolin mit 100 μM Zink sowie unter Zugabe von 100 μM Nitroxolin mit 100 μM Nickel entsprechend dem in den Kapiteln 5.6.1 und 5.6.2 dargestellten Ablauf. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen in Kapitel 6.6.1 aufgetragen.

5.7 Beobachtung der Carbapenemase-Aktivität über 144 Stunden

Im folgenden Versuch wurde über einen Zeitraum von insgesamt 144 Stunden (6 Tage) in mehreren Zwischenschritten die Carbapenemase-Aktivität in getrennten Ansätzen mit Nitroxolin und einem Kontroll-Ansatz beobachtet. Dazu wurde das Experiment in mehrere Einzelversuche, welche in den einzelnen Unterkapiteln beschrieben sind, unterteilt.

Folgender Keim aus dem Universitätsklinikum Jena wurde hierfür verwendet: *Klebsiella pneumoniae* UR 11710/10 (VIM-4).

Zunächst wurden drei 500 ml Erlenmeyerkolben mit sterilem destilliertem Wasser ausgespült und mit folgenden Chemikalien bestückt: 20 μl MgSO_4 , 200 μl Fe^{2+} , 20 μl Ca^{2+} und 100 μl Zn^{2+} und 200 ml M9-Medium (15,06 g Natriumhydrogenphosphat, 6 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1 g Natriumchlorid, 8 ml 0,4 % Glycerol, 2 g Ammoniumchlorid, 2 l Aqua dest.). In je einen Kolben wurden 20 μl (5 μM) bzw. 60 μl (15 μM) Nitroxolin (Stocklösung 1:10 mit DMSO verdünnt) von *Rosenpharma* und in die Kontrolle 60 μl DMSO von *Sigma-Aldrich* hinzugegeben.

Anschließend wurde vom Indikatorstamm das Inokulum hergestellt und die Trübung der entstandenen Suspension auf McFarland-Standard 1,0 eingestellt. Von der Suspension wurden jeweils 2 ml zu jedem Kolben hinzu pipettiert.

Alle Ansätze wurden bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, nachdem jeweils 15 ml für den Nullwert abgenommen wurden.

Weitere 15 ml von jedem Kolben wurden zu folgenden Zeitpunkten abgenommen und in

50 ml Falcons gefüllt: nach 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden. Zu jedem der genannten Zeitpunkte wurden alle in diesem Kapitel beschriebenen Teilversuche durchgeführt.

Jeweils 10 µl jeder Probe wurden für die Verdünnungsreihe und Ausplattierung verwendet. Der Rest wurde bei 4 °C und 11000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand in 15 ml Falcons bei -20 °C eingefroren. Die verbleibenden Pellets wurden in 300 µl PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube pipettiert und über 15 Minuten auf Eis im Ultraschallbad behandelt. Die Lysate wurden nochmals kurz anzentrifugiert und anschließend bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

5.7.1 Verdünnungsreihe und Bestimmung der Lebendzellzahl

Wie unter Kapitel 5.7 bereits beschrieben wurden bei jedem Zeitwert 10 µl der Proben aus jedem Ansatz abgenommen und wie nachfolgend in Abbildung zehn beschrieben verdünnt, mithilfe von sterilen Glasspateln auf Blutagarplatten ausplattiert und anschließend bei 37 °C im Steri-Cycle CO₂-Inkubator für 18 bis 22 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Auszählung der Kolonien zur Bestimmung der Lebendzellzahl (Bast 1999).

0-Stunden-Wert:

10 µl Probe + 990 µl PBS

→ davon 10 µl + 90 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁴/ ml)

→ davon 10 µl + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁵/ ml)

6-Stunden-Wert:

10 µl Probe + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10³/ ml)

→ davon 10 µl + 90 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁴/ ml)

→ davon 10 µl + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁵/ ml)

12-Stunden-Wert:

10 µl Probe + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10³/ ml)

→ davon 10 µl + 90 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁴/ ml)

→ davon 10 µl + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁵/ ml)

→ davon 10 µl + 90 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁶/ ml)

→ davon 10 µl + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁷/ ml)

→ davon 10 µl + 90 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁸/ ml)

24-Stunden-Wert:

10 µl Probe + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10³/ ml)

→ davon 10 µl + 90 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁴/ ml)

→ davon 10 µl + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁵/ ml)

→ davon 10 µl + 90 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁶/ ml)

→ davon 10 µl + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁷/ ml)

→ davon 10 µl + 90 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁸/ ml)

→ davon 10 µl + 990 µl PBS → 100 µl ausplattieren (=10⁹/ ml)

48-, 72-, 96-, 120-, und 144-Stunden-Wert siehe 24-Stunden-Wert

Abb. 10: Verdünnungsreihe (eigene Darstellung)

5.7.2 Herstellen/ Verarbeiten der Lysate

Die bei -80 °C eingefrorenen Lysate (siehe 5.7) wurden auf Eis aufgetaut und erneut bei 4 °C und 13200 rcf für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert in Eppendorf-Tubes zu jeweils zwei Mal 100 µl für die spektrophotometrische Messung und zwei Mal 50 µl für den Bradford-Assay. Die Pellets wurden bei -80 °C eingefroren.

5.7.3 Bradford-Assay

Mithilfe des Bradford-Assay wurde die Proteinkonzentration jedes Zeitwertes aus jedem der drei Ansätze kolorimetrisch bestimmt. Dazu wurde *BioRad*-Reagenz im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und über 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurden 50 µl jeder Probe mit je einem Milliliter des verdünnten BioRad-Reagenz vermischt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve wurde die Proteinkonzentration bestimmt (Bradford 1976, Kruger 1994).

5.7.4 Spektrophotometrische Messung und Berechnung der Carbapenemase-Aktivität

Für sämtliche Proben erfolgte die spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität analog zu dem in Kapitel 5.6.2 beschriebenen Vorgehen.

Für die Berechnung galt die Annahme, dass eine Einheit (1 U) definiert ist als die Menge an Carbapenemase, welche ein Mikromol Imipenem in einer Minute hydrolysiert. Die Berechnung der Carbapenemase-Aktivität erfolgte wie in Abbildung 11 dargestellt.

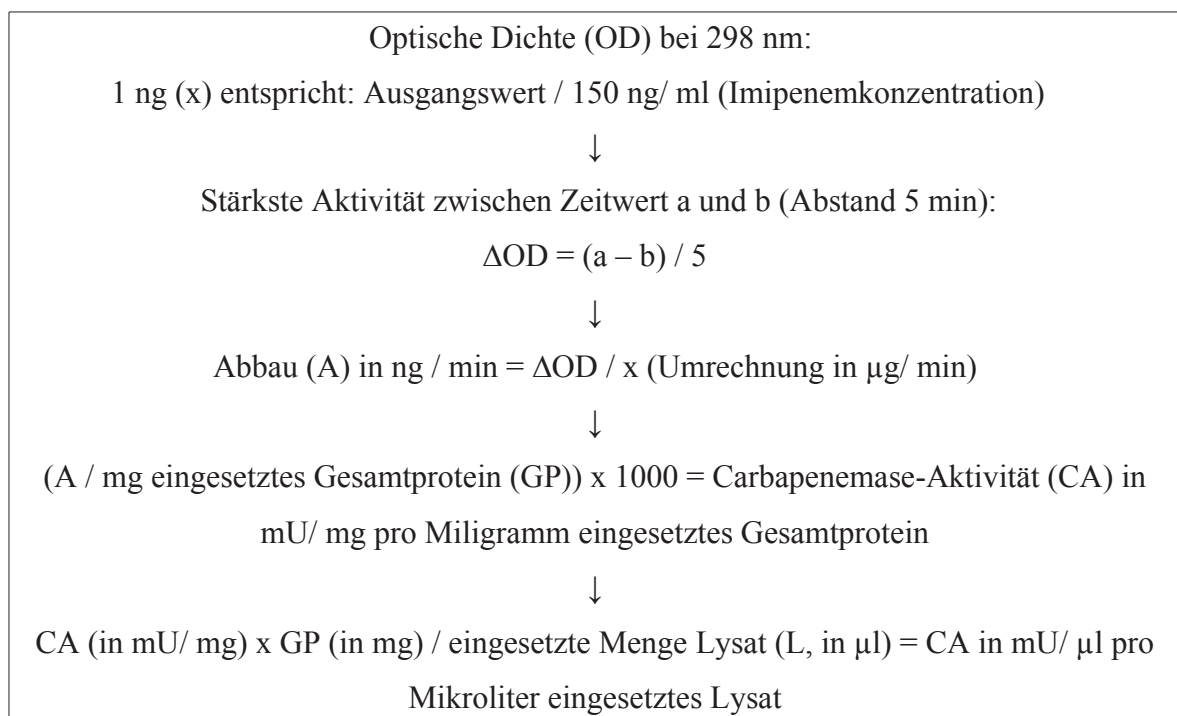


Abb. 11: Berechnung der Carbapenemase-Aktivität (eigene Darstellung)

6 Ergebnisse

Im nachfolgenden Teil der Arbeit erfolgt die Darstellung der Ergebnisse unter Betrachtung der zu Beginn aufgestellten Fragestellungen.

6.1 Modifizierter Hodge-Test

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse des modifizierten Hodge-Tests dargestellt. Die Durchführung (siehe auch Kapitel 5.1) sowie die Auswertung erfolgte anhand der aktuellen CLSI-Empfehlungen (Patel et al. 01/2014).

6.1.1 *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1

Nachfolgend sind in den Abbildungen 12 bis 21 die Ergebnisse des modifizierten Hodge-Tests von *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1 sowie die Positivkontrolle in Abbildung 20 und die Negativkontrolle in Abbildung 21 aufgeführt.

„After 24 hrs, MHT Positive test showed a clover leaf-like indentation of the *Escherichia coli* 25922 growing along the test organism growth streak within the disk diffusion zone“ (Amjad et al. 12/2011: 190).

Dieses Hineinwachsen des sensiblen Indikatorstamms *E.coli* 25922 in den Hemmhof am Kreuzungspunkt mit dem Impfstrich des zu testenden Keimes ist in den Abbildungen 12 bis 19 deutlich zu erkennen, sodass der modifizierte Hodge-Test für *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1 sowohl für Imipenem als auch für Meropenem als positiv zu bewerten ist. Auch bei der Positivkontrolle von *Acinetobacter baumannii* 34/07 in Abbildung 20 ist dieser Effekt bei beiden Carbapenemen zu beobachten.



Abb. 12: Platte 1 *K.oxy.* VA 023780/1 (eigene Fotografie)



Abb. 13: Platte 2 *K.oxy.* VA 023780/1 (eigene Fotografie)



Abb. 14: Platte 3 *K.oxy.* VA 023780/1 (eigene Fotografie)



Abb. 15: Platte 4 *K.oxy.* VA 023780/1 (eigene Fotografie)

In Abbildung 15 (Platte 4) ist die Small Colony Variante von *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1 dargestellt. Auch hier zeigt sich ein positives Ergebnis des MHT wie oben beschrieben.



Abb. 16: Platte 5 *K. oxy.* VA 023780/1 (eigene Fotografie)



Abb. 17: Platte 6 *K. oxy.* VA 023780/1 (eigene Fotografie)



Abb. 18: Platte 6b *K. oxy.* VA 023780/1 (eigene Fotografie)



Abb. 19: Platte 7b *K. oxy.* VA 023780/1 (eigene Fotografie)

In den Abbildungen 18 und 19 sind optisch heller aussehende Kolonien des Bakterienstammes dargestellt. Hier zeigt sich ebenso ein positives Ergebnis entsprechend der o.g. Kriterien.



Abb. 20: Positivkontrolle VA 023780/1 (eigene Fotografie)



Abb. 21: Negativkontrolle VA 023780/1 (eigene Fotografie)

„MHT Negative test showed no growth of the *Escherichia coli* 25922 along the test organism growth streak within the disk diffusion [...]“ (Amjad et al. 12/2011: 190).

Dies zeigt sich ausschließlich bei der Negativkontrolle *E.coli* DSM 710806 in Abbildung 21.

6.1.2 *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/2 und UR 38461/3

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse des MHT von *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/2 und UR 38461/3 aufgeführt, wobei UR 38461/2 die normale Variante, UR 38461/3 die Small Colony Variante darstellt.

Wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben, zeigt sich ein positives Ergebnis, also das Vorhandensein von Carbapenemasen, anhand eines Hineinwachsens des sensiblen Indikatorstamms *E.coli* 25922 in den Hemmhof am Kreuzungspunkt mit dem Impfstrich des zu testenden Keimes.

Dies zeigt sich eindeutig bei der Positivkontrolle in Abbildung 24, jedoch nicht bei dem getesteten Keim in den Abbildungen 22 und 23. In der Negativkontrolle in Abbildung 25 ist dieser Effekt ebenfalls nicht zu beobachten. Es ergibt sich jeweils dasselbe Ergebnis für Imipenem und Meropenem.



Abb. 22: *K.pneu.* UR 38461/2 (eigene Fotografie)



Abb. 23: *K.pneu.* UR 38461/3 (eigene Fotografie)



Abb. 24: Positivkontrolle K.pneu. (eigene Fotografie)



Abb. 25: Negativkontrolle K.pneu. (eigene Fotografie)

6.1.3 Proteus mirabilis VA 026688

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Hodge-Tests von *Proteus mirabilis* VA 026688 dargestellt.

Das Vorkommen einer Carbapenemase zeigt sich, wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben, anhand eines Hineinwachsens des sensiblen Indikatorstamms *E.coli* 25922 in den Hemmhof am Kreuzungspunkt mit dem Impfstrich des zu testenden Keimes.

In der Positivkontrolle in Abbildung 27 lässt sich dieser Effekt eindeutig für beide Carbapeneme nachweisen, während dies weder in der Negativkontrolle (Abbildung 28) noch bei dem getesteten Keim (Abbildung 26) eindeutig der Fall ist.

Dementsprechend ist bei diesem Keim keine Carbapenemase mit der verwendeten Testmethode detektierbar.



Abb. 26: Hodge-Test P.mir. VA 026688 (eigene Fotografie)



Abb. 27: Positivkontrolle VA 026688 (eigene Fotografie)



Abb. 28: Negativkontrolle VA 026688 (eigene Fotografie)

6.2 PCR

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der PCR und der zugehörigen einzelnen Teilversuche aufgeführt.

6.2.1 Messung des DNA-Gehaltes

Bei der Messung des DNA-Gehaltes nach vorhergehender DNA-Isolation (siehe auch Kapitel 5.2.1 und 5.2.2) ergaben sich die in Tabelle acht dargestellten Ergebnisse.

Tab. 8: Messung des DNA-Gehaltes (eigene Darstellung)

Bakterienstamm	DNA-Gehalt (ng/μL)
K.oxy. VA 023780/1 : LCV	66,1
K.oxy. VA 023780/1 : SCV	31,8
K.pneu. UR 38461/2 : LCV	33,9
K.pneu. UR 38461/3 : SCV	21,3

6.2.2 Gel-Elektrophorese nach 16S-rDNA-PCR

In Abbildung 29 ist das Ergebnis der Gel-Elektrophorese nach 16S-rDNA-PCR dokumentiert. Die Zugehörigkeit der einzelnen Bakterienstämme bzw. der Kontrolle sowie des Markers zu den einzelnen Taschen ist der Legende von Abbildung 29 zu entnehmen. Es lässt sich konstatieren, dass alle aufgetragenen Bakterienstämme eine beinahe identische Laufweite aufweisen und demzufolge ähnliche Molekülgrößen aufweisen.

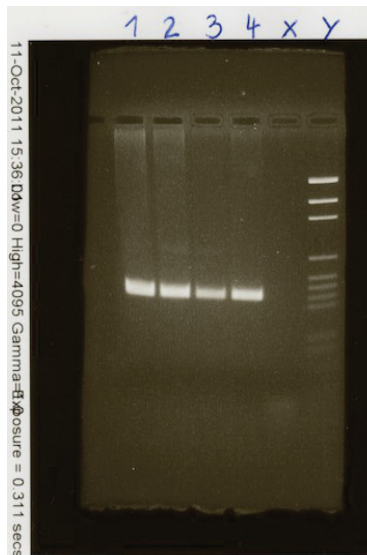


Abb. 29: Gel-Elektrophorese, Legende: 1: K.oxy. VA 023780/1 (LCV), 2: K.pneu UR 38461/2 (LCV), 3: K.pneu UR 38461/3 (SCV), 4: K.oxy. VA 023780/1 (SCV), x: Negativkontrolle, y: PEGM-Marker (eigene Fotografie)

6.2.3 Sequenz-PCR nach 16S-rDNA-PCR

In den Abbildungen 30 bis 33 sind die mit dem *SepsitestTM BLAST*, Version 0.9 ausgewerteten Sequenzen und Ergebnisse der Sequenz-PCR nach 16S-rDNA-PCR (siehe auch Kapitel 5.2.6) dargestellt.

Dabei ergeben sich aus den Sequenzen jeweils die bereits bekannten Bakterienarten.

Sequenz: 1. va 023780/1

```
>Contig_1
CGTAAGGGCCATGATGACTTGAAGGATTAAGGGTTGCGCTCGTTCGCGGACTTAACCAACATTTCACAAACAGAGCTGACGACAGCA
ATCGCTGGCAACAAAGGATTAAGGGTTGCGCTCGTTCGCGGACTTAACCAACATTTCACAAACAGAGCTGACGACAGCA
TGACGACCTGCTTCAGAGTTCCCGAAGGACCAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGATGTCAGAGTAAGTAAAGTTCT
TTCGCTTTCATCGAATTAACCAATGCTCCACGCTTGTGCGGCGCCCGCTCAATTCATTGAGTTTAACTTTCGCG
CTGACTCCCGAGGCGCTGACTTAAGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCCAAGGGAACAACCTCAAGTTCGACATCT
TTACGCGCTGGACTACCA
```

> Positiv. Ähnliche Sequenz(en) in der Datenbank gefunden. <

Familie des Treffers mit der höchsten Sequenzidentität: Enterobacteriaceae

Raoultella ornithinolytica
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.8%; Alignmentlänge = 418 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = U78182

Klebsiella oxytoca
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.8%; Alignmentlänge = 418 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = AF129440

Enterobacter amnigenus
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.5%; Alignmentlänge = 418 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = AB004749

Raoultella terrigena
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.3%; Alignmentlänge = 418 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = Y17658

Pantoea ananatis
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.3%; Alignmentlänge = 418 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = U80196

Raoultella planticola
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.0%; Alignmentlänge = 418 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = AF129443

Abb. 30: Sequenz-PCR K.oxy. VA 023780/1, LCV
(*SepsitestTM BLAST*)

Sequenz: 2. ur 038461/2 12.10.11

```
>'2_assembly'
GTAAAGGGCCATGATGACTTGAAGGATTAAGGGTTGCGCTCGTTCGCGGACTTAACCAACATTTCACAAACAGAGCTGACGACAGCA
ATCGCTGGCAACAAAGGATTAAGGGTTGCGCTCGTTCGCGGACTTAACCAACATTTCACAAACAGAGCTGACGACAGCA
TGACGACCTGCTTCAGAGTTCCCGAAGGACCAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGATGTCAGAGTAAGTAAAGTTCT
TTCGCTTTCATCGAATTAACCAATGCTCCACGCTTGTGCGGCGCCCGCTCAATTCATTGAGTTTAACTTTCGCG
CTGACTCCCGAGGCGCTGACTTAAGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCCAAGGGAACAACCTCAAGTTCGACATCT
TTACGCGCTGGACTACCA
```

> Positiv. Ähnliche Sequenz(en) in der Datenbank gefunden. <

Familie des Treffers mit der höchsten Sequenzidentität: Enterobacteriaceae

Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.5%; Alignmentlänge = 417 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = X87276

Enterobacter cloacae subsp. dissolvens
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.5%; Alignmentlänge = 417 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = Z96079

Klebsiella varicola
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.3%; Alignmentlänge = 417 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = AJ783916

Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.0%; Alignmentlänge = 417 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = Y17657

Enterobacter cloacae subsp. cloacae
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 99.0%; Alignmentlänge = 417 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = AJ251469

Enterobacter cowanii
 Familie = Enterobacteriaceae; Sequenzidentität = 98.6%; Alignmentlänge = 417 (100.0%);
 E-Value = 0.0; Accession = AJ508303

Abb. 31: Sequenz-PCR K.pneu. UR 38461/2
(*SepsitestTM BLAST*)

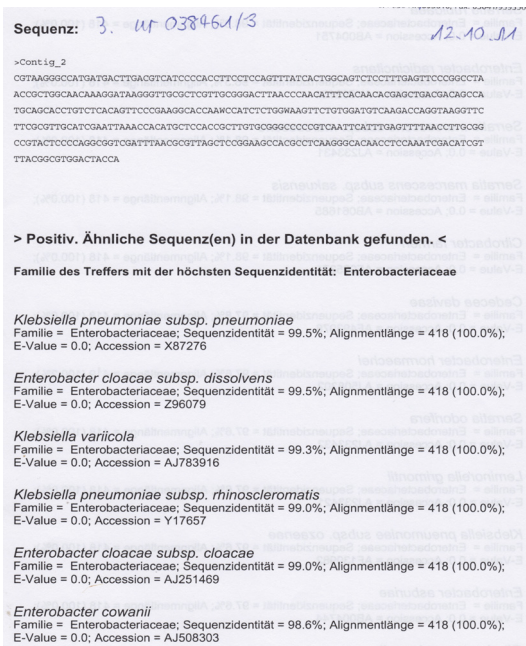


Abb. 32: Sequenz-PCR K.pneu. UR 38461/3
 (Sepsitest™ BLAST)

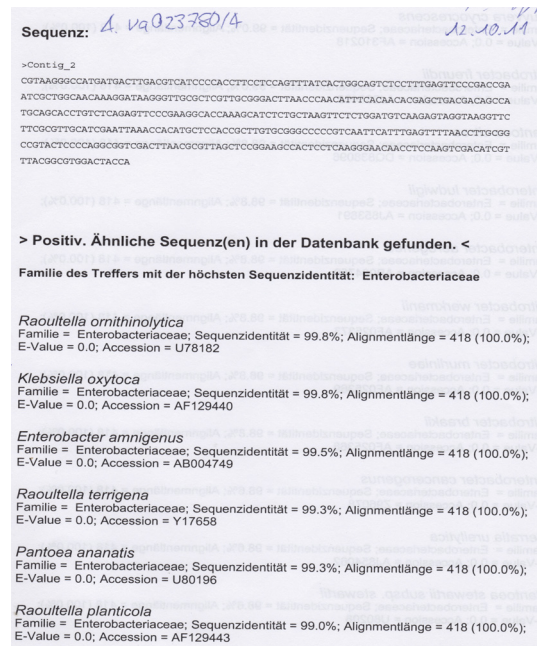


Abb. 33: Sequenz-PCR K.oxy. VA 023780/1, SCV
 (Sepsitest™ BLAST)

6.2.4 Gel-Elektrophorese nach VIM-PCR

In der Abbildung 34 ist das Ergebnis der Gel-Elektrophorese nach VIM-PCR dokumentiert (siehe auch Kapitel 5.2.5). Die Zugehörigkeit der einzelnen Bakterienstämme bzw. der Kontrolle sowie des Markers zu den einzelnen Taschen ist der Legende von Abbildung 34 zu entnehmen. Es ist zu konstatieren, dass alle aufgetragenen Bakterienstämme eine beinahe identische Laufweite aufweisen und demzufolge ähnliche Molekülgrößen aufweisen.

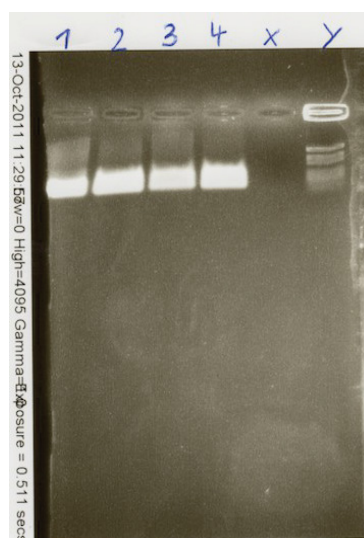


Abb. 34: Gel-Elektrophorese, Legende: 1: K.oxy. VA 023780/1 (LCV), 2: K.pneu UR 38461/2 (LCV), 3: K.pneu UR 38461/3 (SCV), 4: K.oxy. VA 023780/1 (SCV), x: Negativkontrolle, y: PEGM-Marker (eigene Fotografie)

6.2.5 Sequenz-PCR nach VIM-PCR

In Abbildung 35 sind die mithilfe von *Jena Bioscience* ausgewerteten Sequenzen und Ergebnisse der Sequenz-PCR nach VIM-PCR (siehe auch Kapitel 5.2.6) dargestellt.

Dabei ergeben sich aus den Sequenzen die in Tabelle 9 aufgeführten Carbapenemasen.

Tab. 9: Ergebnisse der Sequenz-PCR nach VIM-PCR (eigene Darstellung)

Bakterienstamm	Carbapenemase
K.oxy. VA 023780/1 : LCV	IMP
K.oxy. VA 023780/1 : SCV	IMP
K.pneu. UR 38461/2 : LCV	VIM
K.pneu. UR 38461/3 : SCV	VIM

Oligo 1	
Oligo name:	IMP-F
Oligo Type:	DNA
Sequence (5' to 3')	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC
5' Modification:	none
3' Modification:	none
Shipping Conditions:	lyophilized
Documentation:	Standard
Comment:	

Oligo 2	
Oligo name:	IMP-R
Oligo Type:	DNA
Sequence (5' to 3')	GGTTTAAYAAAACAACCACC
5' Modification:	none
3' Modification:	none
Shipping Conditions:	lyophilized
Documentation:	Standard
Comment:	

Oligo 3	
Oligo name:	VIM-F
Oligo Type:	DNA
Sequence (5' to 3')	GATGGTGTTTGGTCGCATA
5' Modification:	none
3' Modification:	none
Shipping Conditions:	lyophilized
Documentation:	Standard
Comment:	

Oligo 4	
Oligo name:	VIM-R
Oligo Type:	DNA
Sequence (5' to 3')	CGAATGCGCAGCACCAG
5' Modification:	none
3' Modification:	none
Shipping Conditions:	lyophilized
Documentation:	Standard
Comment:	

Abb. 35: Sequenz-PCR nach VIM-PCR (*Jena Bioscience*)

6.3 Agardiffusionstest

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Agardiffusionstests der in Kapitel 5.3 genannten Bakterienpopulationen aufgeführt.

6.3.1 *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1

In den Abbildungen 36 bis 43 sind die Ergebnisse des Agardiffusionstests von *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1 dargestellt. Dabei ist auf der Platte 4 (siehe Abbildung 39) eine Small Colony Variante des Bakterienstammes dargestellt. Auf den Platten 6b (siehe Abbildung 42) und 7b (siehe Abbildung 43) befinden sich optisch heller aussehende Kolonien.

Auf jeder der genannten Abbildungen sind im oberen Teil der Agarplatte die beiden Hemmhöfe um die Imipenem-Testblättchen, im unteren Teil der Hemmhof um das Imipenem-Testblättchen mit EDTA zu sehen.

Entsprechend den CLSI-Empfehlungen sind auf den Abbildungen 36 bis 43 außer auf Abbildung 39 sämtliche Hemmhöfe um die einzelnen Imipenem-Testblättchen im intermediären Bereich der antibakteriellen Aktivität zu finden, da die Hemmhof-Durchmesser jeweils zwischen 20 und 22 Millimetern liegen. Bei der Small Colony Variante (siehe Abbildung 39, Platte 4) waren diese Hemmhof-Durchmesser hingegen 12 Millimeter groß, sodass hier laut den CLSI-Empfehlungen von einer Resistenz auszugehen ist. Dagegen sind auf allen Agarplatten die Hemmhöfe um die Imipenem-Testblättchen mit EDTA jeweils größer als 28 Millimeter und somit laut den CLSI-Empfehlungen als sensibel anzusehen (Patel et al. 01/2014).



Abb. 36: Platte 1 *K. oxytoca* VA 023780/1
(eigene Fotografie)



Abb. 37: Platte 2 *K. oxytoca* VA 023780/1
(eigene Fotografie)



Abb. 38: Platte 3 *K. oxytoca* VA 023780/1
(eigene Fotografie)



Abb. 39: Platte 4 *K. oxytoca* VA 023780/1
(eigene Fotografie)



Abb. 40: Platte 5 *K. oxytoca* VA 023780/1
(eigene Fotografie)



Abb. 41: Platte 6 *K. oxytoca* VA 023780/1
(eigene Fotografie)



Abb. 42: Platte 6b *K. oxytoca* VA 023780/1
(eigene Fotografie)



Abb. 43: Platte 7b *K. oxytoca* VA 023780/1
(eigene Fotografie)

6.3.2 *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/2 und UR 38461/3

Nachfolgend werden die Ergebnisse des Agardiffusionstests von *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/2, der normalen Variante und UR 38461/3, der Small Colony Variante, aufgeführt.

Dabei sind im oberen Teil der Agarplatten auf den Abbildungen 44 und 45 die Hemmhöfe um beide Imipenem-Testblättchen, im unteren Teil der Hemmhof um das Imipenem-Testblättchen mit EDTA dargestellt.

Wie in Kapitel 6.3.1 wurde die Auswertung entsprechend der CLSI-Empfehlungen durchgeführt (Patel et al. 01/2014).

Da sowohl bei der normalen Variante als auch bei der Small Colony Variante dieses Bakterienstammes der Hemmhof-Durchmesser um die einzelnen Imipenem-Testblättchen unter 19 Millimetern lag, ist hier von einer Resistenz auszugehen. Bei den Hemmhöfen um die Imipenem-Testblättchen mit EDTA ergaben sich Hemmhöfe von 21 mm bei UR 38461/2 bzw. von 22 mm bei UR 38461/3, sodass die antibakterielle Aktivität im intermediären Bereich liegt.



Abb. 44: *K. pneumoniae* UR 38461/2
(eigene Fotografie)



Abb. 45: *K. pneumoniae* UR 38461/3
(eigene Fotografie)

6.3.3 Vergleich von Nitroxolin und EDTA im Agardiffusionstest

In der Abbildung 46 sind die Ergebnisse des Agardiffusionstests zum Vergleich von Nitroxolin und EDTA dargestellt.

Die Auswertung wurde entsprechend den CLSI-Empfehlungen von 2014 durchgeführt. Demnach sind die beiden in der Abbildung 46 links und mittig dargestellten Stämme (Klasse-B Carbapenemasen) mit einem Hemmhof-Durchmesser um das Imipenem-Testlättchen unter 19 mm als resistent zu werten, während der in der Abbildung rechts dargestellte Stamm (Klasse-A Carbapenemase) mit einem Hemmhof-Durchmesser von 21 mm mit intermediärer Ansprechrate zu werten ist.

Im unteren Teil sämtlicher Agarplatten ist links der Hemmhof-Durchmesser von Imipenem und EDTA, rechts der Hemmhof-Durchmesser von Imipenem und Nitroxolin dargestellt.

Eine Differenz von mehr als sieben Millimetern dieser beiden Hemmhof-Durchmesser im Vergleich zu Imipenem wird als positiv gewertet.

Während bei *E.coli* und *K.oxytoca* diese Differenz größer als sieben Millimeter und somit als positiv zu werten ist, liegt sie bei *K.pneumoniae* nur bei einem bis zwei Millimetern und ist hier dementsprechend negativ.

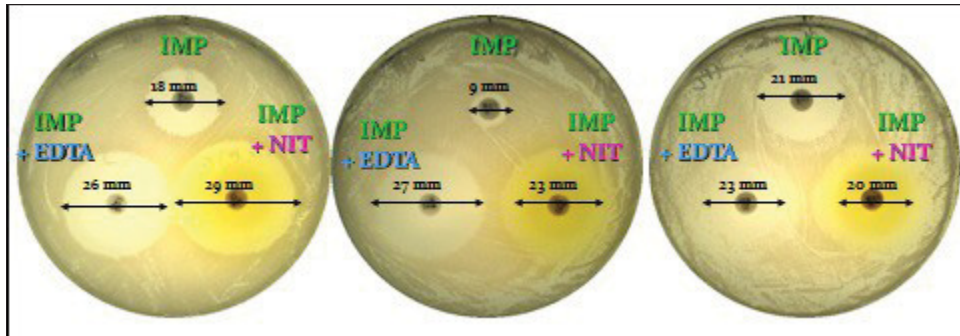


Abb.46: Vergleich von Nitroloxin und EDTA im Agardiffusionstest, von links nach rechts:
E.coli 2/10: NDM-1, *K.oxytoca* 57/07: VIM-1, *K.pneumoniae* 93/08: KPC-2 (eigene Fotografie)

6.4 Checkerboard-Assay

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse des Checkerboard-Assays in Tabelle 10 aufgeführt.

Hier sind die untersuchten Bakterienstämme mit ihrem jeweiligen Genotyp und der Ambler- Klasse dargestellt, sowie der aus dem Versuch errechnete FIC-Index mit der entsprechenden Interaktion, die sich daraus ergibt. Dabei wird der Synergismus durch eine Kombination beschrieben, bei der die FIC-Indizes kleiner als 0,5 sind.

Als Additivität bezeichnet man die Kombination, bei denen die FIC-Indizes um eins liegen. Eine Indifferenz liegt vor, wenn sich die Kombinationspartner nicht gegenseitig beeinflussen und die FIC-Indizes zwischen eins und zwei liegen (Orhan et al. 01/2005).

Tab. 10: Ergebnisse Checkerboard-Assay (eigene Darstellung, siehe auch Kapitel 10.3)

Stamm	Genotyp	Amber-Klasse	FIC- Index	Interaktion
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5/08	VIM-1	B	0.5	Synergismus
<i>Escherichia coli</i> 91/08	KPC-2	A	0.8	Additivität
<i>Enterobacter cloacae</i> 220/09	VIM-1	B	0.5	Synergismus
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 404/08	VIM-4	B	0.5	Synergismus
<i>Enterobacter cloacae</i> 125/08	VIM-1	B	0.5	Synergismus
<i>Klebsiella oxytoca</i> 57/07	VIM-1	B	0.5	Synergismus
<i>Enterobacter cloacae</i> 135/09	VIM-1	B	0.5	Synergismus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 48/09	IMP-16	B	0.8	Additivität
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 238/10	OXA-48	D	0.8	Additivität
<i>Enterobacter cloacae</i> 1/10	OXA-48	D	1.0	Additivität
<i>Escherichia coli</i> 2/10	NDM-1	B	0.5	Synergismus
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 93/08	KPC-2	A	1.0	Additivität
<i>Klebsiella pneumoniae</i> UR11710/1-10	VIM-4	B	0.5	Synergismus
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 16/10	OXA-48	D	0.8	Additivität
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 259/06	KPC-3	A	1.0	Additivität
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 120/10	KPC-3	A	0.8	Additivität
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 119/10	KPC-3	A	1.25	Indifferenz
<i>Escherichia coli</i> 84/08	OXA-48	D	1.25	Indifferenz

6.5 MHK-Bestimmung

„Die niedrigste Konzentration, die das Auswachsen des Inokulums innerhalb von 18 ± 2 Stunden verhindert, wird als minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet“ (Süßmuth et al. 1999: 179).

In der Messreihe mit Zink ergab sich bei beiden Isolaten eine MHK von über 1 mg/ml.

Für Nitroxolin allein ergab sich bei *K.pneu.* eine MHK von 8 µg/ml, genauso wie bei Nitroxolin plus Zink.

Bei *Ps.aer.* ergab sich dagegen für Nitroxolin sowie für Nitroxolin plus Zink jeweils eine MHK von 64 µg/ml.

6.6 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der spektrophotometrischen Messung der Carbapenemase-Aktivität in Form von Diagrammen in den Abbildungen 47 bis 53 dargestellt.

Auf der X-Achse ist jeweils die Zeit in Minuten, auf der Y-Achse die Extinktion bei 298 nm in Prozent aufgetragen. Anhand der Legende rechts in den Abbildungen 47 bis 53 können die Datenreihen den jeweiligen Kurven zugeordnet werden.

In sämtlichen Diagrammen in diesem Kapitel lässt sich erkennen, dass die Carbapenemase-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Nitroxolins im Zeitintervall von 60 Minuten gehemmt wird. Dabei verlaufen die Kurven umso flacher, die Carbapenemase-Aktivität wird demnach umso mehr gehemmt, je höher die Nitroxolin-Konzentration ist.

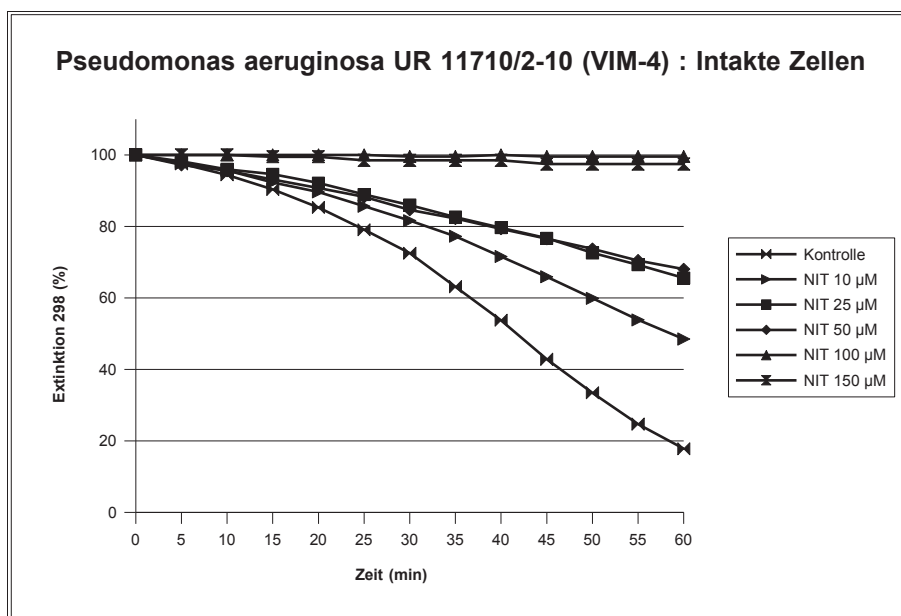


Abb. 47: Spektrophotometrische Messung der CA: *Ps.aer.* UR 11710/2-10, intakte Zellen (eigene Darstellung)

In Abbildung 47 ist die spektrophotometrisch gemessene Carbapenemase-Aktivität in intakten Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* UR 11710/2-10 dargestellt. Es lässt sich konstatieren, dass mit steigender Konzentration an Nitroxolin (siehe Legende rechts in Abbildung 47) die Extinktion in immer geringerem Ausmaß abfällt.

In der Kontrolle zeigt sich ein deutlicher Abfall der Extinktion auf unter 20 Prozent nach 60 Minuten. Bereits bei einer Konzentration von 25 μM Nitroxolin fällt die Extinktion kaum mehr ab und erreicht nach 60 Minuten einen Wert von ca. 65 Prozent vom Ausgangswert.

Bei einer Nitroxolin-Konzentration von 100 μM und 150 μM zeigt sich nur noch ein minimaler Abfall der Extinktion und dementsprechend eine nahezu vollständige Inhibition der Carbapenemase-Aktivität.

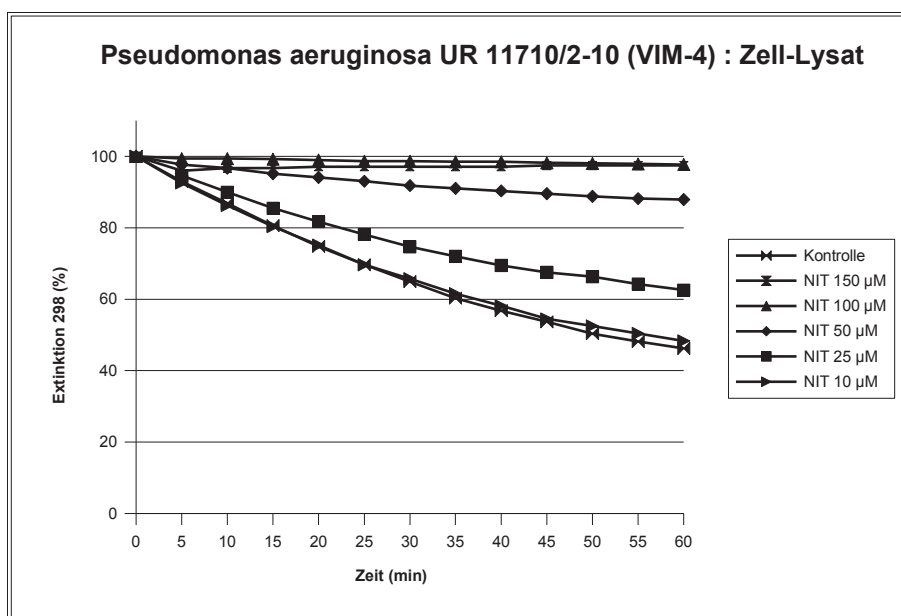


Abb. 48: Spektrophotometrische Messung der CA: Ps.aer. UR 11710/2-10, Zell-Lysat
(eigene Darstellung)

In Abbildung 48 ist die spektrophotometrisch gemessene Carbapenemase-Aktivität in Zell-Lysat von *Pseudomonas aeruginosa* UR 11710/2-10 über den Zeitraum von 60 Minuten dargestellt. Ebenso wie in Abbildung 47 zeigt sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Carbapenemase-Aktivität, wobei dieser Effekt etwas weniger deutlich ausgeprägt ist.

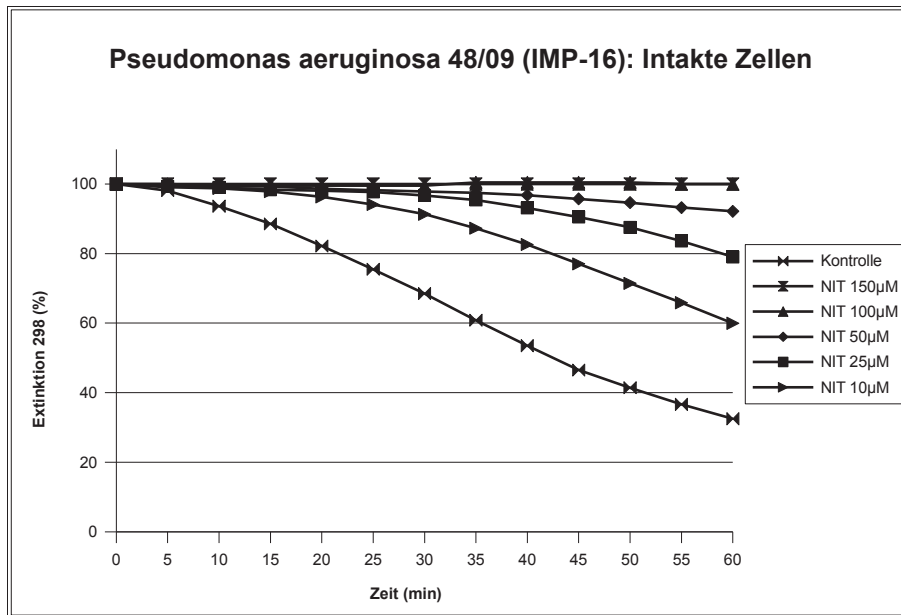


Abb. 49: Spektrophotometrische Messung der CA: Ps.aer. 48/09, intakte Zellen
(eigene Darstellung)

In Abbildung 49 ist die spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität von *Pseudomonas aeruginosa* 48/09 in intakten Zellen im Zeitintervall von 60 Minuten aufgeführt.

Es ist eine deutliche Abhängigkeit der Carbapenemase-Aktivität von der eingesetzten Nitroxolin-Konzentration zu erkennen. Hier fällt die Extinktion bereits bei einer Konzentration von 25 µM Nitroxolin kaum mehr ab und liegt nach einer Stunde etwa bei 80 Prozent, wogegen die Extinktion in der Kontrolle nach 60 Minuten bei unter 40 Prozent angesiedelt ist. Bei höheren Nitroxolin-Konzentrationen lässt sich nur noch ein ganz geringfügiger Abfall der Extinktion konstatieren.

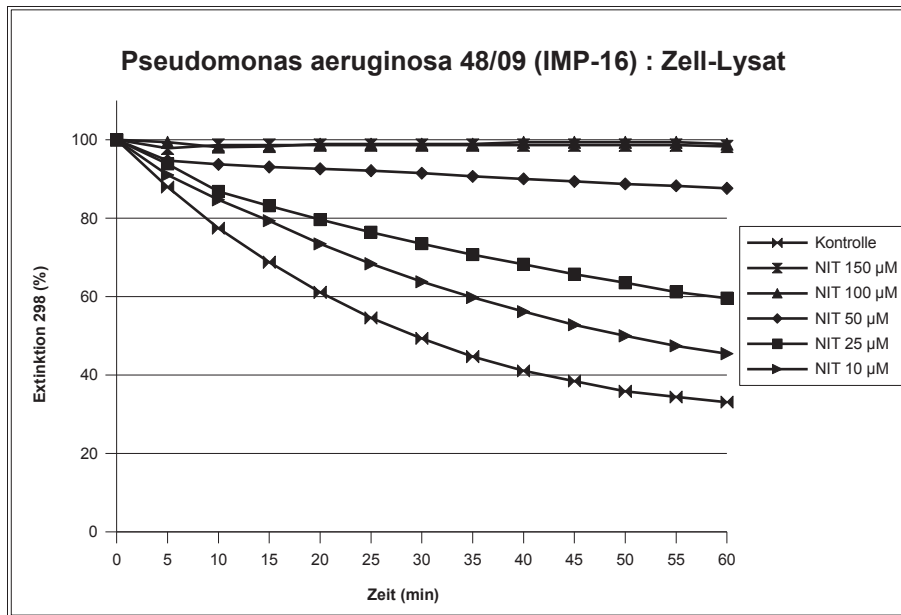


Abb. 50: Spektrophotometrische Messung der CA: Ps.aer. 48/09, Zell-Lysat
(eigene Darstellung)

In Abbildung 50 ist die spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität von *Pseudomonas aeruginosa* 48/09 in Zell-Lysat über den Zeitraum von einer Stunde dargestellt.

Wie in Abbildung 49 zeigt sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Carbapenemase-Aktivität, wobei dieser Effekt weniger deutlich ausgeprägt ist.

Bei einer Konzentration von 25 µM liegt die Extinktion nach 60 Minuten bei etwa 60 Prozent. Bei einer Nitroxolin-Konzentration ab 100 µM ist eine nahezu vollständige Inhibition der Carbapenemase-Aktivität zu sehen.

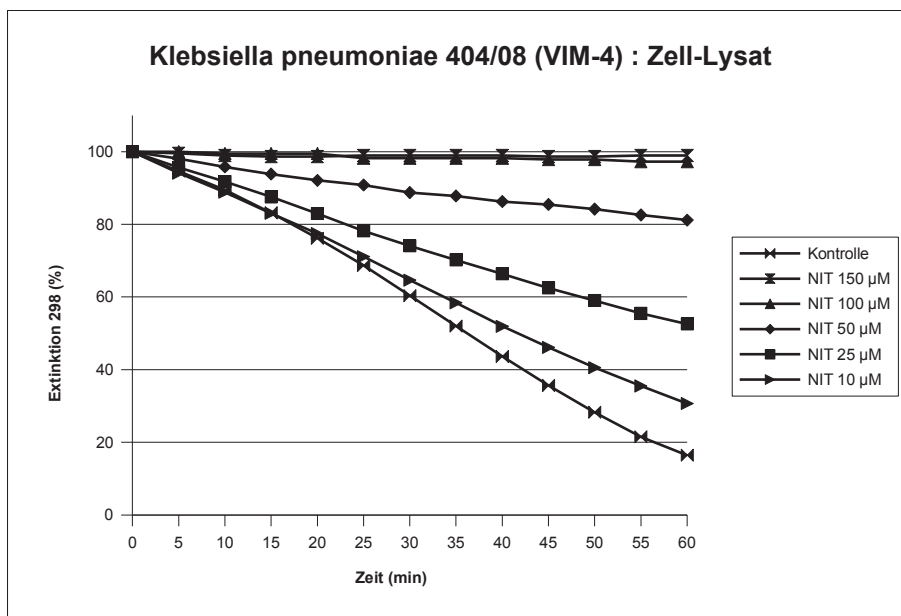


Abb. 51: Spektrophotometrische Messung der CA: K.pneu. 404/08, Zell-Lysat (eigene Darstellung)

In Abbildung 51 ist die spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität von *Klebsiella pneumoniae* 404/08 in Zell-Lysat dargestellt. Es lässt sich konstatieren, dass die Extinktion bei steigender Nitroxolin-Konzentration im Verlauf immer weniger abfällt.

Während die Extinktion bei einer Nitroxolin-Konzentration von 10 µM nach einer Stunde auf etwa 30 Prozent abfällt, sinkt diese bei 50 µM auf 80 Prozent des Ausgangswertes ab.

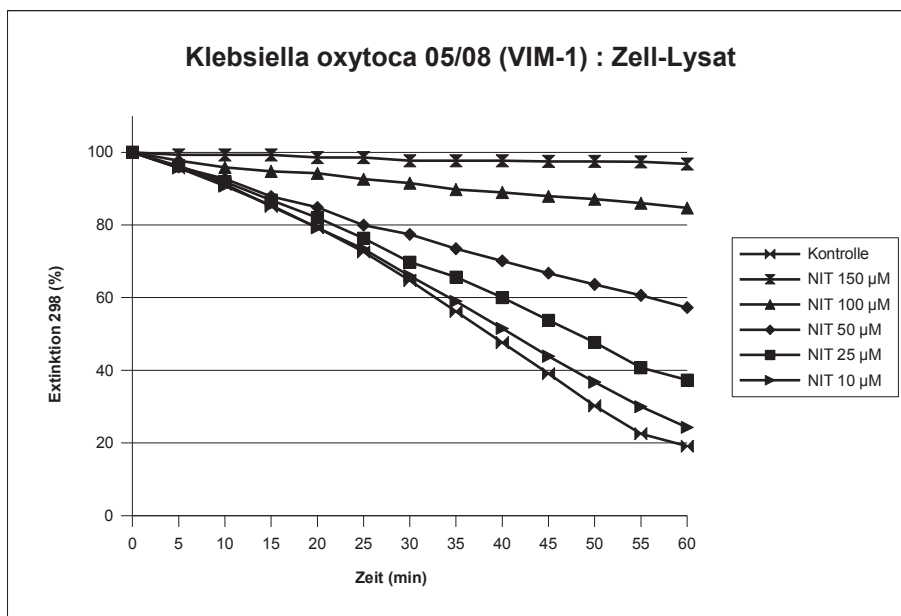


Abb. 52: Spektrophotometrische Messung der CA: K.oxy. 05/08, Zell-Lysat (eigene Darstellung)

In Abbildung 52 ist die spektrophotometrisch gemessene Carbapenemase-Aktivität von *Klebsiella oxytoca* 05/08 in Zell-Lysat aufgetragen. Wie in den vorherigen Abbildungen in diesem Kapitel ist hier ein konzentrationsabhängiger Abfall der Extinktion über einen Zeitraum von 60 Minuten dargestellt. Bei einer Nitroxolin-Konzentration von 150 μM wird eine beinahe komplette Inhibition der Carbapenemase-Aktivität erreicht.

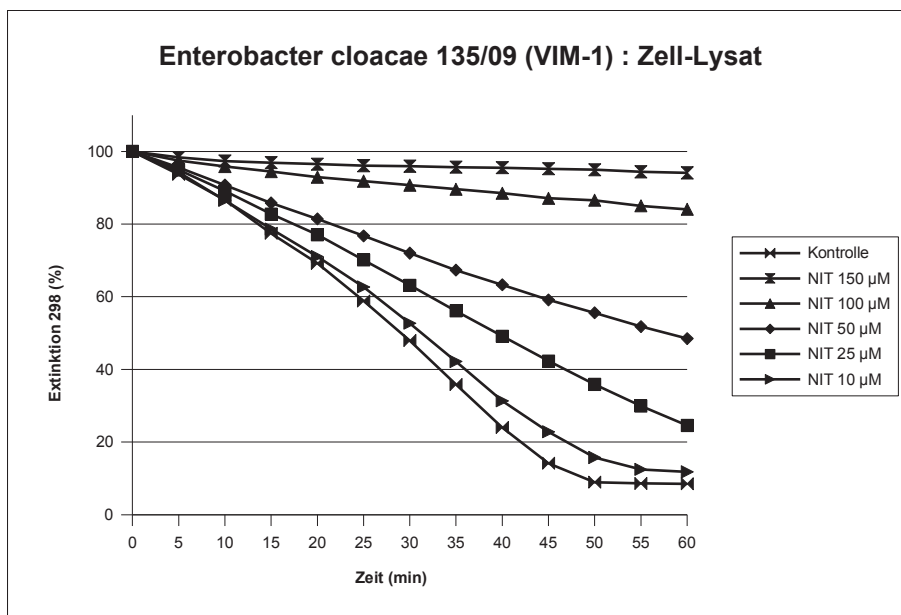


Abb. 53: Spektrophotometrische Messung der CA: *E.cloacae* 135/09, Zell-Lysat (eigene Darstellung)

In Abbildung 53 ist die spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität von *Enterobacter cloacae* 135/09 in Zell-Lysat dargestellt. Hier zeigt sich ebenfalls ein von der Nitroxolin-Konzentration abhängiger Abfall der Extinktion im Zeitverlauf, ähnlich wie in den zuvor beschriebenen Diagrammen in diesem Kapitel.

Während die Extinktion in der Kontrolle nach 60 Minuten auf unter 10 Prozent sinkt, fällt diese bei einer Nitroxolin-Konzentration von 50 μM auf etwa 50 Prozent ab. Bei einer Konzentration von 150 μM Nitroxolin lässt sich nur noch ein minimaler Abfall der Extinktion konstatieren.

6.6.1 Spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität unter Zugabe von Zink bzw. Nickel

In diesem Kapitel ist die spektrophotometrisch gemessene Carbapenemase-Aktivität unter Zugabe von Zink bzw. Nickel als zweiwertige Kationen über ein Zeitintervall von 60

Minuten dargestellt.

Auf der X-Achse ist jeweils die Zeit in Minuten, auf der Y-Achse die Extinktion bei 298 nm in Prozent aufgetragen.

Anhand der Legende rechts in den Abbildungen 54 bis 56 können die Datenreihen den jeweiligen Kurven zugeordnet werden.

In den Abbildungen 54 bis 56 ist zu erkennen, dass die Extinktion bei einer Nitroxolin-Konzentration von 100 μM über den Zeitraum von 60 Minuten kaum abfällt, wohingegen bei der Kontrolle ein deutlicher Abfall zu konstatieren ist.

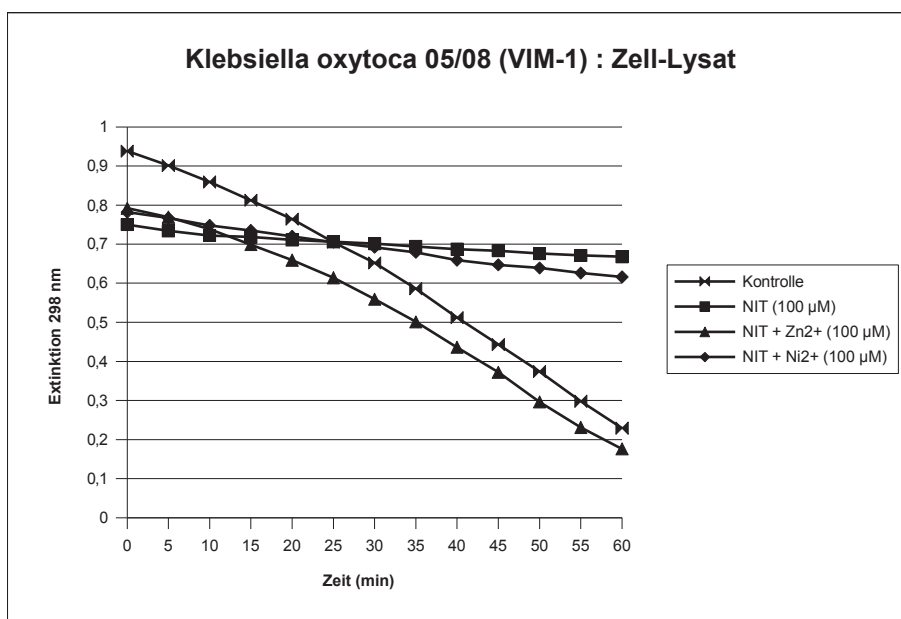


Abb. 54: Spektrophotometrische Messung der CA: K.oxy. 05/08, Zell-Lysat, mit Zink/ Nickel (eigene Darstellung)

In Abbildung 54 ist die spektrophotometrisch gemessene Carbapenemase-Aktivität von *Klebsiella oxytoca* 05/08 in Zell-Lysat unter Zugabe von Zink bzw. Nickel dargestellt.

Es lässt sich konstatieren, dass die Extinktion sowohl bei einer Nitroxolin-Konzentration von 100 μM allein als auch unter Zugabe von Nickel im Zeitverlauf kaum abfällt. Dagegen ist eine deutliche Erniedrigung der Extinktion in der Kontrolle sowie unter Zugabe von Nitroxolin und Zink zu verzeichnen.

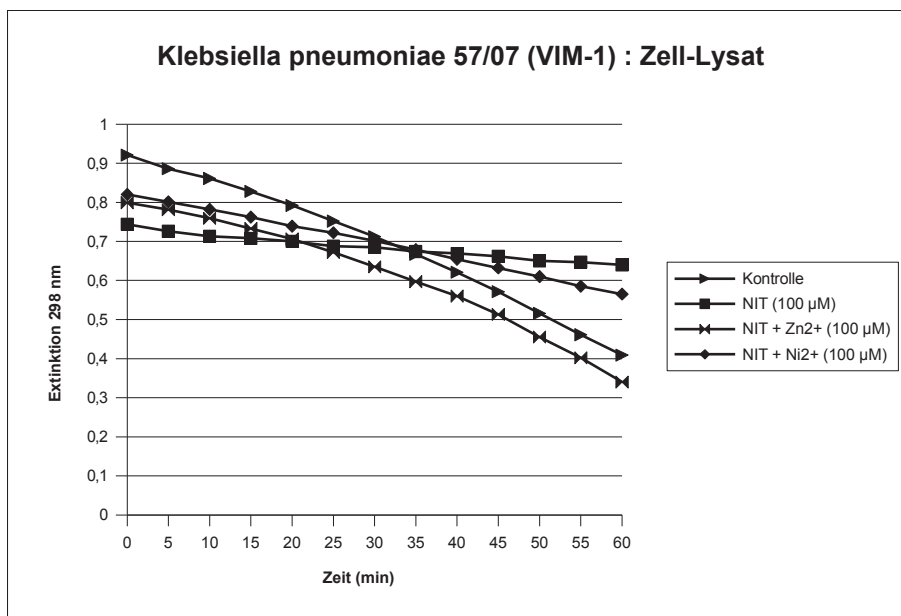


Abb. 55: Spektrophotometrische Messung der CA: K.pneu. 57/07, Zell-Lysat, mit Zink/ Nickel (eigene Darstellung)

In Abbildung 55 ist die spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität von *Klebsiella pneumoniae* 57/07 über einen Zeitraum von 60 Minuten aufgeführt.

Ähnlich wie in Abbildung 54 ist bei einer Konzentration von 100 µM Nitroxolin sowie unter Zugabe von 100 µM Nitroxolin und 100 µM Nickel nur ein minimaler Abfall der Extinktion im Verlauf zu verzeichnen. Dagegen sinkt die Extinktion in der Kontrolle sowie unter Zugabe von Nitroxolin und Zink über einen Zeitraum von einer Stunde deutlich.

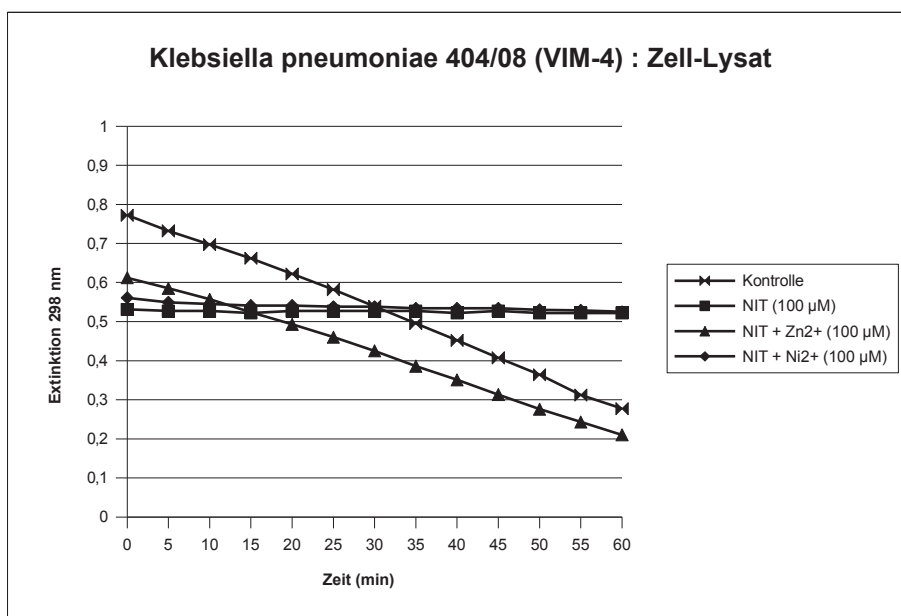


Abb. 56: Spektrophotometrische Messung der CA: K.pneu. 404/08, Zell-Lysat, mit Zink/ Nickel (eigene Darstellung)

In Abbildung 56 ist die spektrophotometrisch gemessene Carbapenemase-Aktivität von *Klebsiella pneumoniae* 404/08 im Zeitintervall von einer Stunde dargestellt. Hier zeigt sich ebenso ein sehr geringfügiger Abfall der Extinktion bei einer Nitroxolin-Konzentration von 100 μM sowie unter Zugabe von Nitroxolin und Nickel.

Hingegen lässt sich sowohl in der Kontrolle als auch unter Zugabe von 100 μM Nitroxolin und 100 μM Zink ein ausgeprägter Abfall der Extinktion im Zeitverlauf konstatieren.

6.7 Beobachtung der Carbapenemase-Aktivität über 144 Stunden

Im nachfolgenden Teil der Arbeit sind die Ergebnisse der einzelnen Teilversuche zur Bestimmung der Carbapenemase-Aktivität unter dem Einfluss von Nitroxolin über einen Zeitraum von 144 Stunden aufgeführt.

6.7.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Wie in Kapitel 5.7.1 beschrieben, erfolgte die Auszählung der Kolonien zur Bestimmung der Lebendzellzahl. Das entsprechende Ergebnis ist in Abbildung 57 graphisch dargestellt.

In der Kontrolle lässt sich bereits nach 6 Stunden ein rasanter Anstieg der Lebendzellzahl konstatieren. Nach 48 Stunden kommt es zu einem langsamen Abfall, während nach 96 Stunden eine deutliche und rasche Verminderung der Lebendzellzahl zu verzeichnen ist.

Im Ansatz mit 5 μM Nitroxolin zeigt sich zwischen sechs und zwölf Stunden ein deutlich langsames Wachstum der Kolonien, erst nach zwölf Stunden kommt es schließlich zum raschen Anstieg der Lebendzellzahl. Ebenso wie in der Kontrolle lässt sich nach 48 Stunden ein rascher Abfall der Lebendzellzahl verzeichnen.

Bei einer Nitroxolin-Konzentration von 15 μM lässt sich in den ersten 24 Stunden nur ein minimales Wachstum konstatieren. Erst nach 24 Stunden ist schließlich ein zügiger Anstieg der Lebendzellzahl zu verzeichnen. Die Wachstumskurve fällt hier erst nach 72 Stunden langsam ab.

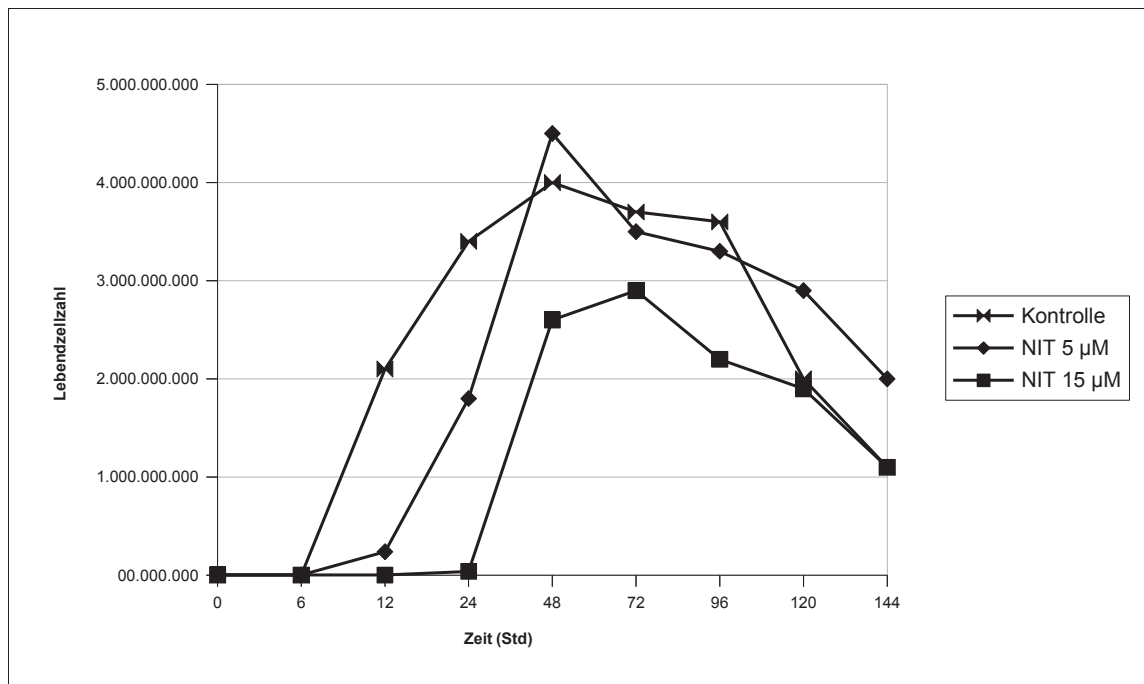


Abb. 57: Bestimmung der Lebendzellzahl von K.pneu. UR 11710/10 über 144 Stunden
(eigene Darstellung)

6.7.2 Bradford-Assay

In Abbildung 58 sind die mithilfe des Bradford-Assay ermittelten Ergebnisse der Proteinbestimmung dargestellt.

In der Kontrolle steigt bis zur fünften Messung nach 48 Stunden die Proteinmenge stetig an. Anschließend kommt es zu einem zunächst steileren, dann kontinuierlichem Abfall der Proteinmenge im Zeitverlauf.

Sowohl bei einer Nitroxolin-Konzentration von 5 µM als auch von 15 µM sind innerhalb der ersten 24 Stunden keine bzw. nur sehr geringe Proteinmengen nachweisbar. Nach 48 Stunden sind jeweils deutlich höhere Proteinmengen zu verzeichnen.

Während sich im Ansatz mit 5 µM Nitroxolin bereits nach 48 Stunden im weiteren Zeitverlauf wieder zunehmend geringere Proteinmengen konstatieren lassen, beginnt die kontinuierliche Abnahme der Proteinmenge im Ansatz mit 15 µM Nitroxolin erst nach 72 Stunden.

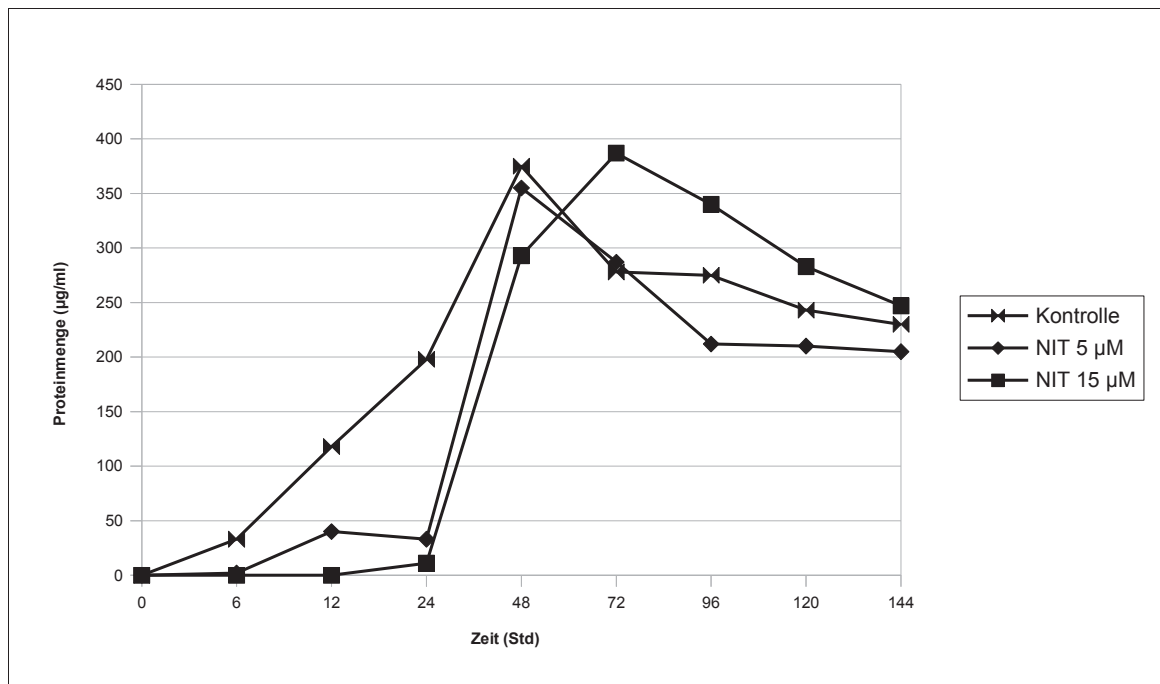


Abb. 58: Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay im Zeitversuch über 144 Stunden bei *K.pneu.* UR 11710/10 (eigene Darstellung)

6.7.3 Spektrophotometrische Messung und Berechnung der Carbapenemase-Aktivität

In Abbildung 59 sind die berechneten Werte der Carbapenemase-Aktivität von *Klebsiella pneumoniae* UR 11710/10 in einem Zeitintervall von 144 Stunden dargestellt (siehe auch Kapitel 5.7.4).

In der Kontrolle zeigt sich bereits im Verlauf der ersten sechs Stunden ein Anstieg der Carbapenemase-Aktivität. Bis zum 48-Stunden-Wert lässt sich ein kontinuierlicher Anstieg konstatieren, danach kommt es schließlich zum Abfall der Carbapenemase-Aktivität.

Ein ähnlicher Kurvenverlauf ergibt sich unter Zusatz von 5 µM Nitroxolin, wobei hier eine Zunahme der Carbapenemase-Aktivität erst nach sechs bis zwölf Stunden zu verzeichnen ist.

Bei einer Nitroxolin-Konzentration von 15 µM steigt die Carbapenemase-Aktivität im Intervall zwischen 12 Stunden und 72 Stunden kontinuierlich an und fällt anschließend rasch wieder ab.

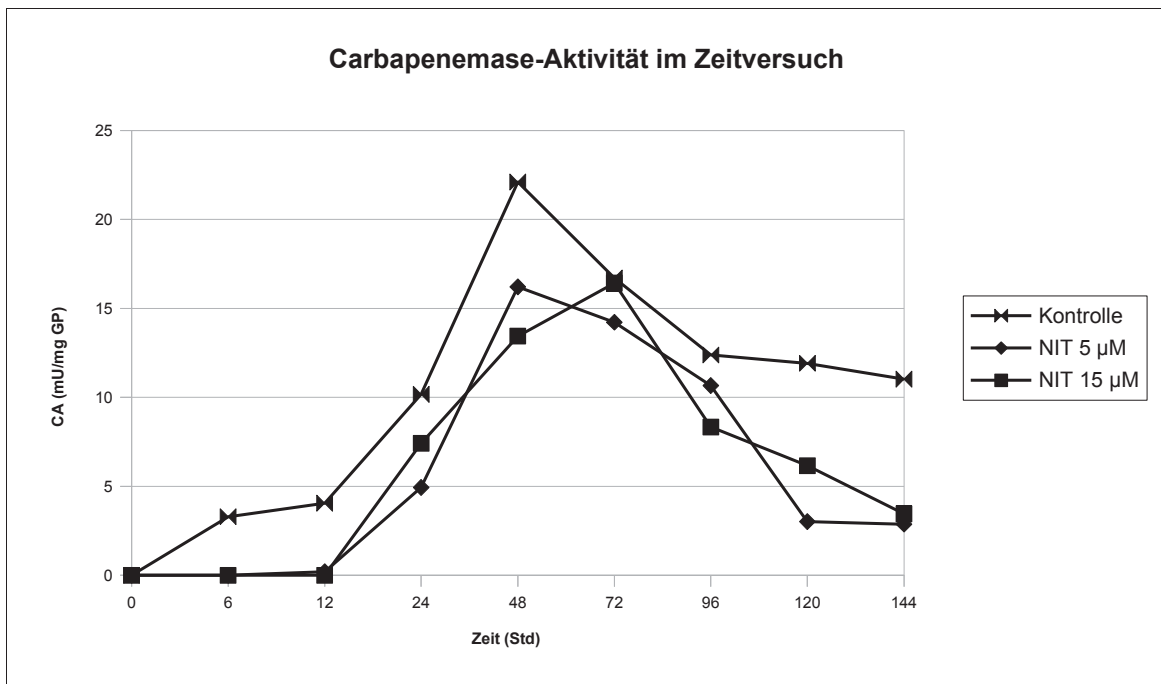


Abb. 59: Berechnete Carbapenemase-Aktivität über 144 Stunden von K.pneu. UR 11710/10
(eigene Darstellung)

Zu der Entwicklung einer alternativen Therapiemöglichkeit bei Infektionen durch Bakterien, welche Carbapenemasen der Metallo- β -Laktamase-Klasse (Ambler Klasse B) produzieren, wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere Methoden erläutert und angewendet, welche nachfolgend noch einmal genau ausgewertet und diskutiert werden.

Als Grundlage dient die Überlegung, dass Nitroxolins als Chelator des Zinkions im aktiven Zentrum von Carbapenemasen der Metallo- β -Laktamase-Klasse agiert und somit die Funktion dieser Enzyme inhibiert.

Zuerst erfolgte dazu der Nachweis, dass Carbapenemasen in den vorliegenden Isolaten vorhanden sind. Dies wurde mithilfe des Hodge-Tests durchgeführt.

Während sich bei *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1 ein eindeutig positives Ergebnis zeigte, war dies bei *Proteus mirabilis* VA 026688 nicht der Fall. Möglicherweise liegen bei dem *Proteus mirabilis* Isolat andere Resistenzmechanismen gegen Carbapeneme vor, wie bspw. ein Porin-Verlust, denn auch in einer PCR konnte das Vorhandensein einer Carbapenemase nicht bestätigt werden.

Auch bei *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/2 und UR 38461/3 ergab sich im MHT ein negatives Ergebnis, obwohl sich in der PCR eindeutig das Vorliegen einer VIM-Carbapenemase bestätigte. Amjad et al. beschreiben zu diesem Problem eine Studie aus Griechenland von 2007, in welcher, gemessen an der als Goldstandard anerkannten PCR, in etwa 98 Prozent der Fälle die Metallo- β -Laktamasen in *Enterobacteriaceae* sicher nachgewiesen wurden. Die Autoren beschreiben den MHT insgesamt als einen einfachen und reliablen Test zur Detektion von Carbapenemasen mit einer sehr geringen Fehlerquote. Das Nationale Referenzzentrum dagegen empfiehlt 2014, den MHT nicht mehr zur phänotypischen Bestätigung von Carbapenemasen zu verwenden, da besonders bei der Detektion von Metallo- β -Laktamasen häufig falsch-negative Ergebnisse auftreten. Hier wird stattdessen auf andere phänotypische Bestätigungstests bzw. besonders auf molekularbiologische Untersuchungsmethoden wie die PCR verwiesen (NRZ 04/2014).

Anschließend wurde die PCR durchgeführt, um die Sequenzen und somit den genauen Typ der vorliegenden Carbapenemase zu prüfen.

Hier konnten in der Sequenz-PCR nach 16S-rDNA-PCR die bereits phänotypisch

bestimmten Bakterienarten von den verwendeten Stämmen *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca* bestätigt werden (siehe auch Kapitel 6.2.3). In der Sequenz-PCR nach VIM-PCR ergaben sich die in Kapitel 6.2.5 dargestellten Ergebnisse. Zusammenfassend konnte in beiden untersuchten Stämmen nach phänotypischem Verdacht durch die PCR das Vorkommen einer Metallo- β -Laktamase bestätigt werden.

Auch Motoshima et al. beschreiben die PCR als eine sehr zuverlässige Methode. Hier wurden Metallo- β -Laktamase produzierende *Pseudomonas aeruginosa* Isolate untersucht, wobei die Sensitivität und Spezifität in der Detektion sowohl des Keims als auch der Metallo- β -Laktamase bei nahezu 100 Prozent lagen. Dennoch wird die durch die Autoren beschriebene Real-Time PCR bisher nur für die Diagnostik bei Mukoviszidose-Patienten eingesetzt (Motoshima et al. 2008).

Ebenso spielte bei dem Leipziger KPC-Ausbruch 2013 die Anwendung eines auf der PCR basierenden CPE-Screenings eine wichtige Rolle bei der Eindämmung der endemischen CPE-Ausbreitung (Lübbert et al. 11/2013).

Hingegen sind auch einige Lücken dieser Methode beschrieben. Beispielsweise veröffentlichten Kaase et al. im September 2012 die Untersuchung einer Multiplex PCR, in welcher einige Carbapenemasen aus der IMP-Familie nicht sicher detektiert werden konnten. Insgesamt wird hier für die Detektion von sämtlichen Carbapenemasen eine Sensitivität von über 96 Prozent beschrieben. Um jedoch eine wirklich reliable Detektion von Carbapenemasen zu gewährleisten und die Kosten möglichst gering zu halten, sollten in Anlehnung an die Aussagen der Autoren weiterhin zunächst phänotypische Tests erfolgen und bei Verdacht auf das Vorliegen einer Carbapenemase gegebenenfalls eine PCR als Bestätigungstest durchgeführt werden (Kaase et al. 09/2012).

Insgesamt ist die Methode durch die Anwendung verschiedener PCR-Kits sehr einfach und schnell durchführbar und liefert im Vergleich zu anderen Verfahren äußerst zuverlässige Ergebnisse bei der Detektion von Metallo- β -Laktamasen, sodass das NRZ ebenfalls empfiehlt, bei positivem Screening eine molekularbiologische Untersuchung zur Bestätigung durchzuführen.

Ein weiterer Test zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemasen ist der Agardiffusionstest. Hier wurde bei mehreren Isolaten die antibakterielle Aktivität von Imipenem sowie der Synergismus zwischen EDTA und Imipenem als Vertreter der

Carbapeneme beurteilt.

Wie in Kapitel 6.3.1 beschrieben, ergab sich laut den CLSI-Empfehlungen von 2014 auf allen Agarplatten von *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1 mindestens ein intermediäres Ansprechen auf Imipenem; bei der SCV zeigte sich sogar eine Resistenz. Die Small Colony Varianten sind langsamer wachsende, in ihren Eigenschaften veränderte Varianten von humanpathogenen Bakterien, welche höhere Resistenzen als die normalen LCV aufweisen. Sie spielen besonders bei chronisch-persistierenden Infektionen eine Rolle und sind sehr schwierig zu behandeln (Roggenkamp et al. 04/2004). Im vorliegenden Agardiffusionstest zeigte sich bei der Kombination von Imipenem und EDTA, im Gegensatz zu den einzelnen Imipenem-Testblättchen, ein Hemmhof, welcher entsprechend den CLSI-Empfehlungen von 2014 als sensibel zu bewerten ist. Dies beweist die synergistische Wirkung von EDTA und Imipenem. Dabei bindet EDTA das Zinkion im aktiven Zentrum der Metallo- β -Laktamase und inhibiert diese dadurch, sodass Imipenem seine bakterizide Wirkung entfalten kann. Dieses Ergebnis ergab sich für *Klebsiella oxytoca* VA 023780/1 sowohl bei der normalen als auch bei der Small Colony Variante.

Bei dem Agardiffusionstest von *Klebsiella pneumoniae* UR 38461/2 (LCV) und UR 38461/3 (SCV) bestand laut CLSI-Empfehlung von 2014 eine Imipenem-Resistenz. Auch bei der Kombination aus Imipenem und EDTA konnte hier nur ein Ansprechen im intermediären Bereich detektiert werden. Eine Ursache dafür kann das Vorhandensein weiterer Resistenzmechanismen gegen Carbapeneme wie bspw. Porinveränderungen oder Effluxpumpen sein (NRZ 04/2014).

Laut Galani et al. 2008 ist dieser EDTA-Synergie-Test eine der besten Methoden zur Detektion von Metallo- β -Laktamasen und könnte durchaus als Teil eines routinemäßigen Screenings auf CPE eingesetzt werden.

Weiterhin wurde die Wirkung von EDTA mit der des Nitroxolins mittels Agardiffusionstest verglichen (siehe auch Kapitel 6.3.3 und Kapitel 3). Hierbei zeigten sich bei *Escherichia coli* 2/10 (NDM-1) und *Klebsiella oxytoca* 57/07 (VIM-1) eine Imipenem-Resistenz, während bei *Klebsiella pneumoniae* 93/08 (KPC-2) laut CLSI-Empfehlungen 2014 ein intermediäres Ansprechen zu konstatieren ist.

Sowohl unter Zugabe von EDTA als auch von Nitroxolin zu den Imipenem-Testblättchen zeigte sich bei den beiden zuerst genannten Isolaten ein signifikanter Unterschied im

Hemmhof-Durchmesser im Vergleich zu Imipenem. Dies beweist einerseits erneut die synergistische Wirkung von EDTA und Imipenem. Andererseits bestätigt sich damit die dem EDTA ähnliche Funktion von Nitroxolin als Chelator des Zinkions im aktiven Zentrum der Metallo- β -Laktamasen, sodass für Nitroxolin und Imipenem ebenfalls eine synergistische Wirkung angenommen werden kann.

Im Gegensatz dazu ist dieser Effekt bei *Klebsiella pneumoniae* 93/08 (KPC-2) nicht ersichtlich. Hier liegt im Vergleich zu den beiden anderen Isolaten eine Carbapenemase der Klasse A nach Ambler vor, welche Serin in ihrem aktiven Zentrum aufweist. Das Serin kann weder durch EDTA noch durch Nitroxolin gebunden werden, sodass deren Funktion als Chelator nicht greifen kann und die hydrolytische Funktion der Carbapenemase demzufolge nicht inhibiert wird (siehe auch Kapitel 4.4.2.1).

Zusammenfassend kann mittels Agardiffusionstest eine synergistische Wirkung von Nitroxolin und Imipenem gegen Carbapenemasen der Metallo- β -Laktamasen (Klasse B nach Ambler) nachgewiesen werden, während dieser Effekt bei Klasse-A Carbapenemasen nicht genutzt werden kann.

Mit dem Checkerboard-Assay konnte schließlich die Interaktion zwischen Imipenem und Nitroxolin genauer betrachtet werden.

Dazu wurde der jeweilige FIC-Index für mehrere Isolate berechnet.

Es ergab sich für zwei der 18 untersuchten Isolate ein FIC-Index zwischen eins und zwei, sodass hier laut Orhan et al. 01/2005 von einer Indifferenz auszugehen ist. Eine Indifferenz ist folgendermaßen definiert: „Keiner der beiden Kombinationspartner beeinflusst die Wirkung des anderen, so daß für die Wirkung der Kombination wie auch der Einzelsubstanz die gleiche Konzentration notwendig ist“ (Süßmuth et al. 1999: 196). Dabei enthält eins der Isolate eine Klasse A-, das andere eine Klasse D- Carbapenemase nach Ambler. Da beide Carbapenemase- Klassen kein Zink, sondern einen Serin-Rest in ihrem aktiven Zentrum aufweisen (siehe auch Kapitel 4.4.2), war hier ohnehin keine synergistische Wirkung durch die Funktion von Nitroxolin als Chelator zu erwarten und das Ergebnis des Agardiffusionstests mit *Klebsiella pneumoniae* 93/08, welche eine Klasse A- Carbapenemase enthält, bestätigt sich erneut (siehe oben).

Außer in den beiden Isolaten, bei denen ein indifferentes Verhalten von Imipenem und Nitroxolin vorliegt (siehe oben), lagen die FIC-Indices von allen untersuchten Isolaten mit

Klasse A- und D- Carbapenemasen um eins, sodass laut Orhan et al. 01/2005 von einer Additivität auszugehen ist. Diese ist folgendermaßen definiert: „Die Wirkungen der Kombinationspartner addieren sich. Um die gleich Wirkung mit der Einzelsubstanz zu erzielen, ist die doppelte Konzentration notwendig“ (Süßmuth et al. 1999: 196). Da wie bereits erwähnt die Funktion von Nitroxolin als Chelator hier nicht greifen kann, liegen hier womöglich weitere Mechanismen vor, welche die Carbapenem-Resistenz durch die Kombination von Nitroxolin und Imipenem herabsetzen. Die Untersuchung und Diskussion solcher Mechanismen würde jedoch weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen, sodass hier nicht näher darauf eingegangen wird.

Außer bei *Pseudomonas aeruginosa* 48/09 war bei allen Isolaten, welche eine Klasse B- Carbapenemase enthalten, ein FIC-Index kleiner als 0,5 zu konstatieren. Dabei handelt es sich laut Orhan et al. 01/2005 um ein synergistisches Verhalten beider Kombinationspartner. „Durch die Kombination wird die Wirkung des aktiveren Kombinationspartners überadditiv verstärkt (potenziert). Um die gleiche Wirkung mit der Einzelsubstanz zu erzielen, ist ein Mehrfaches der Konzentration notwendig, sofern die Kombinationswirkung mit der Einzelsubstanz überhaupt erreichbar ist“ (Süßmuth et al. 1999: 196). Laut Süßmuth et al. muss bei synergistischen Interaktionen nicht bei beiden Kombinationspartnern zwingend eine antibakterielle Aktivität vorliegen. Hier funktionieren auch Kombinationen, bei denen ein Partner eine antibakterielle Aktivität aufweist, während der andere Partner diesen vor Inaktivierungsmechanismen durch die Bakterien schützt. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Kombination von Imipenem und Nitroxolin besitzen zwar beide Partner eine bakterizide Wirkung. Die Ursache für die synergistische Wirkung wird hier jedoch genau mit diesem durch Süßmuth et al. beschriebenen Mechanismus begründet. Nitroxolin inhibiert die Metallo- β -Laktamasen durch seine Funktion als Chelator des Zinkions in deren aktivem Zentrum und verhindert so die hydrolytische Inaktivierung von Imipenem durch diese Klasse an Carbapenemasen.

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Bakterien wurde schließlich die MHK von Nitroxolin beurteilt.

Bei *Klebsiella pneumoniae* UR 11710/10 ergab sich für Nitroxolin eine MHK von 8 $\mu\text{g/ml}$. Pfister et al. beschreiben 2014 MHK-Werte von 4 $\mu\text{g/ml}$ für Nitroxolin bei *Klebsiella* spp. und erzielen damit ähnliche Werte. Da die MHK sowohl von der Inkubationszeit und der

Größe und Wachstumsphase des Inokulums als auch von dem benutzten Nährmedium und dessen Eigenschaften wie bspw. Zusammensetzung und pH-Wert abhängen, lassen sich die minimal unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise durch Variationen dieser Faktoren in beiden Versuche begründen.

Bei *Pseudomonas aeruginosa* UR 11710/10 ergab sich für Nitroxolin eine MHK von 64 µg/ml. Hier ergaben sich auch bei Pfister et al. 10/2014 Werte zwischen 2 µg/ml bis 128 µg/ml.

Einen weiteren großen Teil der Arbeit nahm die spektrophotometrische Messung der Carbapenemase-Aktivität ein.

Es lässt sich bei allen untersuchten Isolaten eine von der Nitroxolin-Konzentration abhängige Inhibition der Carbapenemasen der Klasse B nach Ambler konstatieren. Dabei nimmt die Carbapenemase-Aktivität mit steigender Nitroxolin-Konzentration ab. Bei 100 bis 150 µM eingesetztem Nitroxolin wird eine vollständige Inhibition der jeweiligen Carbapenemase erreicht, sodass die bakterizide Wirkung des Imipenems wieder einsetzt. Dieser Effekt ist unabhängig von der Bakterienart, welche die Metallo-β-Laktamase enthält (siehe auch Kapitel 10.3). Auch bei *Pseudomonas aeruginosa* 48/09 ist die von der Nitroxolin-Konzentration abhängige Hemmung der Metallo-β-Laktamase eindeutig nachvollziehbar, obwohl hier im Checkerboard-Assay die Interaktion zwischen Imipenem und Nitroxolin nur als additiv beschrieben ist, während bei den anderen untersuchten Isolaten ein Synergismus bestätigt wurde.

Weiterhin wurde die Trübungsmessung unter Verwendung von intakten Bakterien mit der Anwendung von Zell-Lysat verglichen. Hierbei lässt sich konstatieren, dass die von der Nitroxolin-Konzentration abhängige Hemmung der Carbapenemasen in den Messungen mit intakten Bakterien wesentlich deutlicher zu verzeichnen ist als in den Messungen mit Zell-Lysat. Dies kann ein Hinweis auf eine Akkumulation von Nitroxolin in den intakten Zellen sein. Diesen Effekt beobachteten auch Pelletier et al. 03/1995. Hier beschreiben die Autoren, dass die Konzentrationen von Nitroxolin innerhalb der Zellen um das 40- bis 70-fache höher waren als in dem vorhandenen Medium. Als mögliche Ursache wird dafür eine reversible Bindung des Nitroxolins an äußere Strukturen der Bakterien angenommen (Pelletier et al. 03/1995).

Vergleichbare Messungen wurden mit Isolaten, welche Klasse A- und D- Carbapenemasen

enthalten, durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in dieser Arbeit nicht dargestellt, da dies über den Rahmen der Arbeit hinausgehen würde. Hier konnte eine Inhibition der Carbapenemase durch Nitroxolin nicht nachgewiesen werden.

Bei der spektrophotometrischen Messung der Carbapenemase-Aktivität unter Zugabe zweiwertiger Kationen ergaben sich für *Klebsiella oxytoca* 05/08, *Klebsiella pneumoniae* 57/07 und *Klebsiella pneumoniae* 404/08 jeweils ähnliche Ergebnisse (siehe auch Kapitel 6.6.1). Es lässt sich konstatieren, dass in den Messungen der Kontrolle sowie unter Zugabe von Nitroxolin und Zink die Extinktion deutlich abfällt, während unter alleiniger Zugabe von Nitroxolin sowie unter Zugabe von Nitroxolin und Nickel eine beinahe vollständige Inhibition der Carbapenemase-Aktivität zu verzeichnen ist. Da Nitroxolin theoretisch alle zweiwertigen Kationen binden kann, müsste auch die Zugabe von Nickel einen Effekt auf den Kurvenverlauf haben. Die hydrolytische Wirkung der Metallo- β -Laktamasen ist jedoch von einem Zinkion in ihrem aktiven Zentrum, aber nicht von Nickel abhängig. Ausschließlich die Zugabe von Zink scheint die Bindung zwischen Nitroxolin und Zink im aktiven Zentrum der Metallo- β -Laktamasen kompetitiv zu verdrängen, sodass die hydrolytische Aktivität der Carbapenemase überwiegt.

Im letzten Versuch wurde die Carbapenemase-Aktivität der VIM-4 von *Klebsiella pneumoniae* UR 11710/10 in verschiedenen Ansätzen mit Nitroxolin-Konzentrationen von 5 μ M und 15 μ M sowie in einem Kontroll-Ansatz über einen Zeitraum von 144 Stunden beobachtet. Dazu erfolgten mehrere Teilversuche.

Einer der Teilversuche beinhaltete eine Verdünnungsreihe sowie die Bestimmung der Lebendzellzahl durch Auszählen der gewachsenen Kolonien. Da hier in allen Ansätzen eine statische Kultur angelegt und beobachtet wurde, wachsen und vermehren sich die Bakterien in den von Nethe-Jaenchen 2008 beschriebenen typischen Wachstumsphasen. Dabei ist die Anlaufphase, in welcher sich die Bakterien an die neuen Bedingungen anpassen, in der Kontrolle besonders ausgeprägt, während sie sich unter Zugabe von Nitroxolin konzentrationsabhängig verlängert. Hier greift die in der Arbeit bereits mehrfach beschriebene synergistische Wirkung von Nitroxolin und Imipenem, welche das bakterielle Wachstum in Abhängigkeit von der Nitroxolin-Konzentration zunehmend hemmt und verzögert. Die exponentielle Phase, in welcher die Bakterienpopulation eine maximale Wachstumsrate erreicht, verläuft in allen drei Ansätzen ähnlich, jedoch mit

zeitlichem Abstand nacheinander (siehe auch Kapitel 6.7.1). Diese Beschleunigungsphase verläuft bei einer Nitroxolin-Konzentration von 15 μM wesentlich später als beispielsweise in der Kontrolle. Die stationäre Phase findet sich ausschließlich in der Kontrolle angedeutet. In beiden Ansätzen mit Nitroxolin fehlt diese Phase weitgehend und es schließt sich direkt die Absterbephase an, in welcher sämtliche Energiereserven der Zellen aufgebraucht sind.

Ein weiterer Teilversuch war die Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay (siehe auch Kapitel 6.7.2). „Einzelne chemische Zellbestandteile lassen sich zur direkten Bestimmung der Biomasse heranziehen, [...]. [...]. Von diesen wird routinemäßig meist der Zellproteingehalt bestimmt. Er dient vor allem als Bezugsgröße für Stoffwechsel- und Enzymaktivitäten“ (Bast 1999: 334). Während in der Kontrolle die Proteinmenge innerhalb der ersten 48 Stunden stetig ansteigt, kommt es in beiden Ansätzen mit Nitroxolin erst nach 24 Stunden zu einem deutlichen Anstieg der Proteinkonzentration. Die Abnahme der Proteinmenge im Verlauf beginnt in der Kontrolle sowie im Ansatz mit 5 μM Nitroxolin bereits nach 48 Stunden, während sie im Ansatz mit 15 μM Nitroxolin zeitverzögert erst nach 72 Stunden beginnt. Die Ergebnisse der Proteinbestimmung sind mit den Ergebnissen der Bestimmung der Lebendzellzahl vergleichbar und liegen einerseits begründet im typischen Wachstumsverhalten einer statischen Kultur. Andererseits erkennt man anhand beider Teilversuche die synergistische Wirkung von Imipenem und Nitroxolin im Vergleich zu der Kontrolle, da das bakterielle Wachstum bzw. die Proteinmenge trotz nachgewiesener Metallo- β -Laktamase (VIM-4) der *Klebsiella pneumoniae* UR 11710/10 in den Ansätzen mit Nitroxolin erst mit deutlicher Zeitverzögerung nach Ende der Halbwertszeit der Antibiotika beginnt.

Als letzter Teilversuch der Beobachtung der Carbapenemase-Aktivität über 144 Stunden erfolgte die spektrophotometrische Messung sowie die Berechnung der Carbapenemase-Aktivität (siehe auch Kapitel 6.7.3). Hier ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei der Proteinbestimmung sowie der Bestimmung der Lebendzellzahl. In der Kontrolle werden zum Zeitpunkt der maximalen Wachstumsrate deutlich höhere Carbapenemase-Aktivitäten erreicht als in den Ansätzen mit Nitroxolin. Diese Tatsache beweist erneut die Inhibition der Metallo- β -Laktamasen durch Nitroxolin. Zudem tritt unter Nitroxolin der Anstieg der Carbapenemase-Aktivität konzentrationsabhängig zunehmend später ein.

Abschließend lässt sich konstatieren, dass Carbapenemasen und im Speziellen Metallo- β -Laktamasen (Carbapenemasen der Klasse B nach Ambler) durch die Kombination der angewendeten Verfahren sicher nachgewiesen werden konnten.

Weiterhin konnte eine synergistische Wirkung von Nitroxolin und Imipenem als Vertreter der Carbapeneme mittels verschiedenen Methoden bestätigt werden, sodass diese Kombination theoretisch durchaus als alternative Therapiemöglichkeit bei Infektionen durch CPO in Frage kommen kann.

Unklar bleibt bisher, in welcher Dosierung, in welchen zeitlichen Abständen und über welchen Zeitintervall die Kombination aus Imipenem und Nitroxolin verabreicht werden müsste, um eine adäquate Therapie dieser Infektionen zu ermöglichen, wobei diesbezüglich in dieser Arbeit mittels der Beobachtung der Carbapenemase-Aktivität über einen Zeitraum von 144 Stunden bereits Ansätze für weitere Untersuchungen geschaffen wurden.

Hierzu müssen zunächst weitere in vitro-Experimente stattfinden wie beispielsweise MHK-Bestimmungen für die genannte Medikamentenkombination anhand der häufigsten Metallo- β -Laktamase produzierenden Bakterienarten, um einer praktischen Anwendung näher zu kommen.

Desweiteren ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass möglicherweise auch die Art der Anwendung beider Antibiotika als problematisch betrachtet werden könnte. Während Nitroxolin peroral als Weichkapsel verabreicht wird, steht Imipenem nur zur intravenösen Applikation zur Verfügung (Rote Liste 2014).

Auch hierzu sollten gegebenenfalls weitere Forschungen angestellt werden. Möglich wäre beispielsweise die Entwicklung neuer Entwürfe von intravenös zu verabreichenden Nitroxolin-Analoga. Dadurch könnte eine solche Kombinationstherapie aus Imipenem und Nitroxolin in Zukunft möglicherweise auch als vollständig intravenös zu verabreichende Therapie etabliert werden. Diese Weiterentwicklung käme insbesondere Risikopatienten zugute (siehe auch Kapitel 2).

Besonders vorteilhaft ist, dass nicht die bakterizide Wirkung von Nitroxolin genutzt wird, sondern dessen Funktion als Chelator und Inhibitor der Metallo- β -Laktamasen. Daher spielen mögliche zukünftige Resistenzen gegen Nitroxolin eine untergeordnete Rolle, sodass diese alternative Therapiestrategie, bestehend aus der Kombination von Nitroxolin

und Imipenem, eine besonders sichere Methode zur Therapie von Infektionen mit Metallo- β -Laktamase produzierenden Bakterien darstellen kann.

8 Schlussfolgerungen

Mit der vorliegenden Arbeit konnte die Grundlage für die Entwicklung einer alternativen Therapiemöglichkeit bei Infektionen mit CPO geschaffen werden, im Besonderen für Infektionen durch Bakterien, welche Carbapenemasen der Metallo- β -Laktamase-Klasse (Ambler Klasse B) produzieren.

Zum Nachweis von Carbapenemasen in den einzelnen Isolaten war insbesondere die Kombination verschiedener Methoden (modifizierter Hodge-Test und Agardiffusionstest als phänotypische Bestätigungstests) sehr hilfreich. Eine zuverlässige Detektion der einzelnen Metallo- β -Laktamasen gelang mittels Sequenz-PCR in Kombination mit den genannten phänotypischen Bestätigungstests. Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei vorliegender Carbapenem-Resistenz nicht nur die Detektion von Carbapenemasen eine Rolle spielt, da viele weitere Mechanismen als Ursache der Resistenz in Frage kommen. Die Erfassung der gesamten Resistenzmechanismen ist im klinischen Alltag sicherlich schwierig zu bewerkstelligen. Dennoch ist hier die Weiterentwicklung der Screening-Methoden wichtig und notwendig, da die Zahl und Ausbreitung der Carbapenemasen in Zukunft vermutlich weiter ansteigen wird (siehe auch Kapitel 2).

Weiterhin konnte im Agardiffusionstest bestätigt werden, dass Nitroxolin ähnlich wie EDTA als Chelator des Zinkions im aktiven Zentrum der Metallo- β -Laktamasen fungiert und somit die hydrolytische Aktivität der Klasse B- Carbapenemasen nach Ambler inhibiert (siehe auch Kapitel 2 und 7).

Dieser Mechanismus wurde genutzt, um eine synergistische Wirkung von Imipenem und Nitroxolin zu erzielen. Diese konnte für die meisten der untersuchten Isolate, welche Klasse B- Carbapenemasen produzieren, mittels Checkerboard-Assay bestätigt werden. Bei Klasse A- sowie Klasse D- Carbapenemasen konnte dieser Effekt nicht detektiert werden (siehe auch Kapitel 7).

Mittels spektrophotometrischer Messung konnte gezeigt werden, dass Nitroxolin die hydrolytische Spaltung von Imipenem durch die Metallo- β -Laktamasen in konzentrationsabhängiger Weise inhibiert. Dieser Effekt zeigte sich deutlicher in intakten Zellsuspensionen als in Zell-Lysaten. Als Grund wird hierfür eine Akkumulation von Nitroxolin in den Zellen angenommen. Eine vollständige Hemmung dieser

Carbapenemasen wird bei einer Nitroxolin-Konzentration von 100 bis 150 μM erreicht (siehe auch Kapitel 6.6 und 7).

Über einen Zeitraum von 144 Stunden bewirkte der Synergismus von Nitroxolin und Imipenem ein verlangsamtes und abgeschwächtes bakterielles Wachstum bei Metallo- β -Laktamase produzierenden Bakterienstämmen (siehe auch Kapitel 7).

Die Inhibition der Metallo- β -Laktamasen kann durch die Zugabe von freiem Zink wieder aufgehoben werden, was sich ebenfalls unter Verwendung der spektrophotometrischen Messung bestätigte.

Zusammenfassend wird aus der vorliegenden Arbeit ersichtlich, dass neben der Umsetzung von Antibiotic-Stewardship-Programmen und der Anwendung von Kombinationen aus bereits bekannten Breitspektrum-Antibiotika wie Tigecyclin und Colistin (siehe auch Kapitel 2) auch die Entwicklung neuer Antibiotika sowie ganz besonders die Erarbeitung alternativer Therapiestrategien die weitere Ausbreitung von Infektionen mit Carbapenemase-produzierenden Bakterien eindämmen kann. Dabei kann die Anwendung der Kombination von Nitroxolin und Imipenem zur Therapie von Infektionen durch Metallo- β -Laktamase produzierende Bakterien bei entsprechender Weiterentwicklung eine vielversprechende alternative Therapiemethode darstellen.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aguado Garcia J.M. Multidrug-resistant bacteria in solid organ-transplant recipients. 25th ECCMID, Copenhagen, DK, April 25-28, 2015, E056.
- Alexander S.K., Strete D., Kothe E. 2006. Mikrobiologisches Grundpraktikum: ein Farbatlas. München [u.a.]: Pearson Studium.
- Ambler R. P. 1980. The structure of β -lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B 289:321-331.
- Amjad A. , Mirza I.A., Abbasi S.A., Farwa U., Malik N., Zia F. 12/2011. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. Iranian Journal of Microbiology. Department of Microbiology, Armed Forces Institute of Pathology, Rawalpindi Pakistan. Vol. 3, No. 4. 189-193
- Bast E. 1999. Mikrobiologische Methoden : Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Erste Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2000 Buch und Zeitschriften Vlg.
- Bialvaei A.Z., Samadi Kafil H. 04/2015. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. Curr Med Res Opin. 31(4):707-21.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: Analytical Biochemistry. Vol. 72, 248-254.
- Bush, K. & Jacoby, G. A. 2010: Updated Functional Classification of β -Lactamases. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 54(3):969-976.
- Darai G., Handermann M., Sonntag H.-G., Tidona C.A., Zöller L. 2009. Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. Dritte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

- Dechert U. 2012. Kapitel 2: Gelelektrophoresen. In: Jansohn M., Rothhämel S. (Hrsg.). 2012. Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Fünfte Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 37 ff.
- Fachinfo-Service® Rote Liste. 08/2015. Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels): Nitroxolin forte (Rosenpharma) . Frankfurt: Fachinformationsverzeichnis Deutschland, Rote Liste® Service GmbH. <<http://www.fachinfo.de/suche/fi/009370>> (Zugriff: 22.01.2016).
- Flora S.J.S., Pachauri V. 2010. Review: Chelation in Metal Intoxication. International Journal of Environmental Research and Public Health. 7, 2745-2788.
- Füssle R., Willems W. R. 2007. Antiinfektiva. In: Schmidt H., Estler C.-J., Allendörfer J. 2007. Pharmakologie und Toxikologie: für Studium und Praxis; mit 281 Tabellen. Sechste Aufl. Stuttgart [u.a.]: Schattauer, 785-893.
- Galani I., Rekatsina P.D., Hatzaki D., Plachouras D., Souli M., Giamarellou H. 2008. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo- β -lactamase production in Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008. 61, 548-553.
- Glasner C., Albiger B., Buist G., Tambić Andrašević A., Canton R., Carmeli Y., Friedrich A.W., Giske C.G., Glupczynski Y., Gniadkowski M., Livermore D.M., Nordmann P., Poirel L., Rossolini G.M., Seifert H., Vatopoulos A., Walsh T., Woodford N., Donker T., Monnet D.L., Grundmann H., the European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. 02/2013. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries. Euro Surveill. 2013;18(28):pii=20525.

- Grundmann H., Glasner C., Magiorakos A-P., Högberg-Diaz L., Monnet D.L., Albiger B. European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. ECDC TECHNICAL REPORT: Carbapenemase-producing bacteria in Europe: Interim results from the European survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) project 2013. Stockholm: ECDC.
- Grundmann H., Livermore D.M., Giske C.G., Canton R., Rossolini G.M., Campos J., Vatopoulos A., Gniadkowski M., Toth A., Pfeifer Y., Jarlier V., Carmeli Y., the CNSE Working Group. 11/2010. Euroroundups: Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts.
- Heesemann J. 2001. Die Familie der Enterobacteriaceae. In: Köhler W., Eggers H.J., Fleischer B., Marre R., Pfister H., Pulverer G. Hrsg. 2001. Medizinische Mikrobiologie. Achte Aufl. München, Jena: Urban und Fischer Verlag.
- Hof H., Dörries R., Geginat G. 2005. Medizinische Mikrobiologie : 198 Tabellen ; nach neuer AO - mit den Fächern: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Klinische Infektiologie, Hygiene. Dritte Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Hof H. 2014. Teil D Bakteriologie. In: Hof H., Dörries R., Geginat G., Schlüter D., Wendt C. 2014. Medizinische Mikrobiologie : Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene. Fünfte Aufl. Stuttgart: Thieme, 277-462.
- Ho Jeon, J., Hun Lee, J., Lee, J.J., Seung Park, K. Mustafa Karim, A., Lee, C., Chul Jeong, B., S. Hee Lee (2015). Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. International Journal of Molecular Sciences, 16, 9655-9692.
- Holinski-Feder E. 2011. Kapitel 1.6 DNA-Untersuchung – Diagnostische Anwendung beim Menschen. In: Murken J.D., Grimm T., Holinski-Feder E., Zerres K. 2011. Taschenlehrbuch Humangenetik. Achte Aufl. Stuttgart: Thieme, 106.

- Holpert C., Kramer A. 1999. Nitroxolin. In: Von Bruchhausen F., Ebel S., Hackenthal E., Holzgrabe U. 1999. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Folgeband 5: Stoffe L-Z. Berlin [u.a.]: Springer-Verlag, 328-330.
- Kaase M. 2012. Carbapenemasen bei gramnegativen Erregern in Deutschland: Daten des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz. 55: 1401-1404.
- Kaase M., Szabados F., Wassill L., Gatermann S.G. 09/2012. Detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae by a Commercial Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. September 2012. 50 (9): 3115-3118.
- Kassis-Chikhani N., Saliba F., Carbonne A., Neuville S., Decre D., Sengelin C., Guerin C., Gastiaburu N., Lavigne-Kriaa A., Boutelier C., Arlet G., Samuel D., Castaing D., Dussaix E., Jarlier V. 2010. Surveillance and outbreak reports Extended measures for controlling an outbreak of VIM-1 producing imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a liver transplant centre in France, 2003–2004. Euro Surveill. 2010;15(46):pii=19713.
- Kruger, N. J. 1994. The Bradford method for protein quantitation. In: Methods in Molecular Biology. Basic Protein and Peptide Protocols. Vol. 32, 9-15.
- Lee C.G., Burgess D.S. 2012. Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 11 (32).
- Lübbert C., Lippmann N., Rodloff A.C. 11/2013. Hochresistente Enterobakterien: Systematisches Screening ist notwendig. Deutsches Ärzteblatt Jg. 110, 46: A2206-2207.

- Lübbert C. 05/2014. Aktuelles Wissen für Anästhesisten: Refresher Course Nr 40: Update nosokomiale Infektionen – Lehren aus dem Leipziger KPC-Ausbruch. Leipzig, 71-75.
- Lüllmann H., Mohr K., Hein L. 2006. Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker; 129 Tabellen. Sechzehnte Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Lüllmann H., Mohr K., Hein L., Kuschinsky, G. 2010. Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker. Siebzehnte Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Brock T.D., Lazar T., Thomm M. 2009. Brock Mikrobiologie. Elfte Aufl. München [u.a.]: Pearson Studium.
- Marie-Clémence Verdier, Olivier Tribut, Pierre Tattevin, Yves Le Tulzo, Christian Michelet and Danièle Bentué-Ferrer. 10/2011. Simultaneous Determination of 12 -Lactam Antibiotics in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection: Application to Therapeutic Drug Monitoring. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 55, No. 10. 4873–4879.
- Miller M.B., Gilligan P.H. 2012. Chapter 290: Mechanisms and Detection of Antimicrobial Resistance. In: Long S.S., Pickering L.K., Prober C.G. 2012. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases: 4th Edition. Churchill Livingstone: Elsevier, 1421 ff.

- Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein M., Galani I., Giske C.G., Gniadkowski M., Malamou- Lada E., Martinez-Martinez L., Navarro F., Nordmann P., Peixe L., Pournaras S., Rossolini G.M., Tsakris A., Vatopoulos A., Cantón R. 02/2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issue. *Clinical Microbiology and Infection*. 16 (2): 112–122.
- Motoshima, M., Yanagihara K., Yamamoto K., Morinaga Y., Matsuda J., Sugahara K., Hirakata Y., Yamada Y., Kohno S., Kamihira S. 2008. Quantitative detection of metallo-beta-lactamase of blaIMP-cluster-producing *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis for rapid diagnosis and treatment of nosocomial infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008. 61(2): p. 222-6.
- Mularoni A., Vizzini G., Campanella M., Gona F., Arena G., Di Carlo D., Conaldi P.G., Palazzo U., Gridelli B., Grossi P. Successful containment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae spread at a multi-organ transplant institute: a single centre experience. 25th ECCMID, Copenhagen, DK, April 25-28, 2015, EP045.
- Nethe-Jaenchen R. 2008. Kapitel 7: Mikrobielles Wachstum. In: Munk K. (Hrsg.) 2008. Taschenlehrbuch Biologie – Mikrobiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 257-303.
- Nordmann P., Naas T., Poirel L. 11/2011. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 17, No. 10, 1791-1798.
- NRZ (Nationales Referenzzentrum). 04/2014. NRZ RATGEBER CPE 2.0 Erkennen – Kontrollieren – Therapieren.
- Orhan G., Bayram A., Zer Y., Balci I. 01/2005. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43, No. 1, 140–143.

- Patel J.B. et al. 01/2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol. 34, No. 1: M100-S24.
- Pelletier C., Prognon P., Bourlioux P. 03/1995. Roles of Divalent Cations and pH in Mechanism of Action of Nitroxoline against *Escherichia coli* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 1995, 39 (3): 707–713.
- Pfister W., Sobke A., Jonczyk T., Werner T., Baier M., Fünfstück R. 10/2014. Meeting Abstract: Untersuchungen zur Resistenz von Erregern bei Harnwegsinfektionen stationärer Patienten gegenüber Nitroxolin. *Infektiologie Update 2014*. 24. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG). Weimar, 16.-18.10.2014. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2014. Doc14peg41.
- Pletz M.W., Eckmann C., Hagel S., Heppner H.J., Huber K., Kämmerer W., Schmitz F.-J., Wilke M., Grabein B. 2015. Multiresistente Erreger – Infektionsmanagement 2015. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 140: 975-981. Georg Thieme Verlag.
- Poirel L., Walsh T.R., Cuvillier V., Nordmann P. 05/2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 70 (2011): 119-123.
- Queenan, A. M. & Bush, K. (2007): Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. In: *Clinical Microbiology Reviews*. Volume 20(3):440-458.
- Quiagen 11/2006. QIAquick® Spin Handbook For QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, 18 ff.
- Richter G. 2003. *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken*. Stuttgart, New York: Thieme, 73 ff.

- Robert Koch-Institut. 05/2013. Zur aktuellen Situation bei Carbapenemase-bildenden gramnegativen Bakterien: Ein Bericht des NRZ für gramnegative Krankenhauserreger. Epidemiologisches Bulletin Nr. 19: 167-176.
- Rodloff A. 2009. Kapitel 15.1 Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung: Grundlagen, Verfahren, Standards. In: Neumeister B., Geiss H.K., Braun R.W., Kimmig P., begründet von Burkhardt F. 2009. Mikrobiologische Diagnostik : Bakteriologie - Mykologie - Virologie -Parasitologie ; 288 Tabellen. Zweite, vollst. überarb. Aufl. - Stuttgart [u.a.] : Thieme.
- Roggenkamp A., Hoffmann H., Hornef M.W. 04/2004. Growth Control of Small-Colony Variants by Genetic Regulation of the Hemin Uptake System. Infect Immun. 2004 Apr; 72(4): 2254–2262.
- Rote Liste 2014 – Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte. Rote Liste® Service GmbH (Herausgeber und Verlag). Frankfurt/ Main. 54. Ausgabe.
- Sadava D., Hillis D.M., Heller H.C., Berenbaum M.R. 2011. Purves Biologie. Aus dem Englischen übersetzt von Held A., Jarosch B., Niehaus-Osterloh M., Seidler L., Wink C. Deutsche Übersetzung herausgegeben von Jürgen Markl. Neunte Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schmidt K.-H. 02/2009. Arbeitsanweisung 16S und 18S rDNA PCR-Analytik: mibi_lv_sq_16S_18S_pcr_saa_v03.doc. Universitätsklinikum Jena – Institut für Medizinische Mikrobiologie.
- Schneider E. 2007. Die Prokaryonta und die prokaryontische Zelle. In: FuchsG. Hrsg. 2007. Allgemeine Mikrobiologie. Achte Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Seifert H. 2009. Kapitel 21 Gramnegative aerobe und fakultativ anaerobe Stäbchen. In: Neumeister B., Geiss H.K., Braun R.W., Kimmig P., begründet von Burkhardt F.

2009. Mikrobiologische Diagnostik : Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie ; 288 Tabellen. Zweite, vollst. überarb. Aufl. - Stuttgart [u.a.] : Thieme.

Sopirala M.M., Mangino J.E., Gebreyes W.A., Biller B., Bannerman T., Balada-Llasat J.-M., Pancholi P. 11/2010. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. Vol. 54, No. 11, 4678–4683.

Spellberg B., Guidos R., Gilbert D., Bradley J., Boucher H.W., Scheld W.M., Bartlett J.G., Edwards J.E., Jr. 2008. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases 46:155–164.

Stratton C.W., Serial Editor Laposata M. 2012. Clinical microbiology: Quality in laboratory diagnosis (Diagnostic standards of care series). New York, Demos Medical Publishing, 89 ff.

Süßmuth R., Eberspächer J., Haag R., Springer W. 1999. Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum. Zweite Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.

Talbot G.H., Bradley J., Edwards J.E., Jr., Gilbert D., Scheld M., Bartlett J.G. 2006. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases 42:657–668.

Tenover F. C. 2010. Chapter A19: Challenges in antimicrobial susceptibility testing of clinical and environmental isolates. In: Choffnes E.R., Relman D.A., Mack A., Rapporteurs, Forum on Microbial Threats, Board on Global Health, Institute of Medicine. 2010. Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies: Workshop Summary. Washington, DC: The National Academies Press, 365 ff.

- Tumbarello M., Viale P., Viscoli C., Trecarichi E.M., Tumietto F., Marchese A., Spanu T., Ambretti S., Ginocchio F., Cristini F., Losito A.R., Tedeschi S., Cauda R., Bassetti M. 2012. Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing *K. pneumoniae*: Importance of Combination Therapy. *Clinical Infectious Diseases* 2012;55(7):943–50.
- Vahlensieck jr. W. 1999. Prophylaxemaßnahmen bei rezidivierenden Harnwegsinfektionen. In: Hofstetter A., Hrsg. 1999. Urogenitale Infektionen. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 215-235.
- Vishwanatha T. et al. 2011. Antibiotic synergy test: Checkerboard Method On Multidrug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. *International Research Journal Of Pharmacy*. 2 (12), 196-198.
- Wätzig V. 2010. Therapie von bakteriellen Infektionen. In: Herdegen T. 2010. Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie: 328 Tabellen. Zweite Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 397-414.
- Wehling M. 2005. Klinische Pharmakologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Wiegand, I. 2003. Molekulare und biochemische Grundlagen der β -Lactam-Resistenz durch β -Lactamasen. *Chemoth*; 12:151-167.
- Witte W., Mielke M. 2003. B-Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum: Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen für die Prävention. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*. 46: 881-890.
- Wöstemeyer J. 2009. Mikrobiologie. Stuttgart: Ulmer.
- Yan Sun, Yun Cai, Xu Liu, Nan Bai, Beibei Liang, Rui Wang. 02/2013. The emergence of clinical resistance to tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 41 (2): 110–116.

Yetkin M.A., Kanyilmaz D., Aksu N., Baran I., Mumcuoglu I., Gokcinar D., Bastug A., Bodur H. Carbapenemresistance in Klebsiella: Risk factors for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae colonization in elderly patients. 25th ECCMID, Copenhagen, DK, April 25- 28, 2015, P1042.

Ziesing S., Heim A., Vonberg R.-P. 2012. Kapitel 18: Methoden der mikrobiologischen Diagnostik. In: Sebastian Suerbaum S., Hahn H., Burchard G.-D., Kaufmann S.H.E., Schulz T.F. Hrsg. 2012. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin [u.a.]: Springer.

10 Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Zunahme der Carbapenemasen.....	4
Abb. 2:	Verbreitung von CPE in Europa.....	5
Abb. 3:	Imipenem	13
Abb. 4:	Meropenem	13
Abb. 5:	Ertapenem	13
Abb. 6:	Nitroxolin: Grundstruktur (links) und Funktion als Chelator (rechts).....	15
Abb. 7:	Molekulare Einordnung β -Laktamasen	21
Abb. 8:	Berechnung des FIC-Index.....	34
Abb. 9:	96-Well-Mikrotiterplatte.....	35
Abb. 10:	Verdünnungsreihe.....	40
Abb. 11:	Berechnung der Carbapenemase-Aktivität.....	41
Abb. 12:	Platte 1 <i>K.oxy.</i> VA 023780/1.....	43
Abb. 13:	Platte 2 <i>K.oxy.</i> VA 023780/1.....	43
Abb. 14:	Platte 3 <i>K.oxy.</i> VA 023780/1.....	43
Abb. 15:	Platte 4 <i>K.oxy.</i> VA 023780/1.....	43
Abb. 16:	Platte 5 <i>K.oxy.</i> VA 023780/1.....	44
Abb. 17:	Platte 6 <i>K.oxy.</i> VA 023780/1.....	44
Abb. 18:	Platte 6b <i>K.oxy.</i> VA 023780/1.....	44
Abb. 19:	Platte 7b <i>K.oxy.</i> VA 023780/1.....	44
Abb. 20:	Positivkontrolle VA 023780/1.....	44
Abb. 21:	Negativkontrolle VA 023780/1.....	44
Abb. 22:	<i>K.pneu.</i> UR 38461/2.....	45
Abb. 23:	<i>K.pneu.</i> UR 38461/3.....	45
Abb. 24:	Positivkontrolle <i>K.pneu.</i>	46
Abb. 25:	Negativkontrolle <i>K.pneu.</i>	46

Abb. 26:	Hodge-Test <i>P.mir.</i> VA 026688.....	46
Abb. 27:	Positivkontrolle VA 026688.....	47
Abb. 28:	Negativkontrolle VA 026688.....	47
Abb. 29:	Gel-Elektrophorese, Legende: 1: <i>K.oxy.</i> VA 023780/1 (LCV), 2: <i>K.pneu</i> UR 38461/2 (LCV), 3: <i>K.pneu</i> UR 38461/3 (SCV), 4: <i>K.oxy.</i> VA 023780/1 (SCV), x: Negativkontrolle, y: PEGM-Marker.....	48
Abb. 30:	Sequenz-PCR <i>K.oxy.</i> VA 023780/1	48
Abb. 31:	Sequenz-PCR <i>K.pneu.</i> UR 38461/2.....	48
Abb. 32:	Sequenz-PCR <i>K.pneu.</i> UR 38461/3	49
Abb. 33:	Sequenz-PCR <i>K.oxy.</i> VA 023780/1, SCV	49
Abb. 34:	Gel-Elektrophorese, Legende: 1: <i>K.oxy.</i> VA 023780/1 (LCV), 2: <i>K.pneu.</i> UR 38461/2 (LCV), 3: <i>K.pneu.</i> UR 38461/3 (SCV), 4: <i>K.oxy.</i> VA 023780/1 (SCV), x: Negativkontrolle, y: PEGM-Marker	49
Abb. 35:	Sequenz-PCR nach VIM-PCR	50
Abb. 36:	Platte 1 <i>K. oxytoca</i> VA 023780/1	52
Abb. 37:	Platte 2 <i>K. oxytoca</i> VA 023780/1.....	52
Abb. 38:	Platte 3 <i>K. oxytoca</i> VA 023780/1	52
Abb. 39:	Platte 4 <i>K. oxytoca</i> VA 023780/1	52
Abb. 40:	Platte 5 <i>K. oxytoca</i> VA 023780/1	52
Abb. 41:	Platte 6 <i>K. oxytoca</i> VA 023780/1	52
Abb. 42:	Platte 6b <i>K. oxytoca</i> VA 023780/1.....	53
Abb. 43:	Platte 7b <i>K. oxytoca</i> VA 023780/1.....	53
Abb. 44:	<i>K. pneumoniae</i> UR 38461/2.....	54
Abb. 45:	<i>K. pneumoniae</i> UR 38461/3.....	54
Abb. 46:	Vergleich von Nitroxolin und EDTA im Agardiffusionstest, von links nach rechts: <i>E.coli</i> 2/10: NDM-1, <i>K.oxytoca</i> 57/07: VIM-1, <i>K.pneumoniae</i> 93/08: KPC-2.....	55
Abb. 47:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>Ps.aer.</i> UR 11710/2-10, intakte Zellen.....	57

Abb. 48:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>Ps.aer.</i> UR 11710/2-10, Zell-Lysat.....	58
Abb. 49:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>Ps.aer.</i> 48/09, intakte Zellen	59
Abb. 50:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>Ps.aer.</i> 48/09, Zell-Lysat	60
Abb. 51:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>K.pneu.</i> 404/08, Zell-Lysat.....	61
Abb. 52:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>K.oxy.</i> 05/08, Zell-Lysat.....	61
Abb. 53:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>E.cloacae</i> 135/09, Zell-Lysat.....	62
Abb. 54:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>K.oxy.</i> 05/08, Zell-Lysat, mit Zink/ Nickel.....	63
Abb. 55:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>K.pneu.</i> 57/07, Zell-Lysat, mit Zink/ Nickel.....	64
Abb. 56:	Spektrophotometrische Messung der CA: <i>K.pneu.</i> 404/08, Zell-Lysat, mit Zink/ Nickel.....	64
Abb. 57:	Bestimmung der Lebendzellzahl von <i>K.pneu.</i> UR 11710/10 über 144 Stunden.....	66
Abb. 58:	Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay im Zeitversuch über 144 Stunden bei <i>K.pneu.</i> UR 11710/10	67
Abb. 59:	Berechnete Carbapenemase-Aktivität über 144 Stunden von <i>K.pneu.</i> UR 11710/10.....	68
Abb. 60:	Poster 63. Jahrestagung DGHM 2011.....	96

10.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	„Pharmakokinetische Daten, Handelsnamen und Dosierung der Carbapeneme“.....	14
Tab. 2:	Resistenzmechanismen von Antibiotika.....	17
Tab. 3:	Mastermix-Ansatz für 5 Proben.....	28
Tab. 4:	Cycle-Sequenz-PCR-Ansatz	30
Tab. 5:	Programm <i>etcycle</i> im <i>Eppendorf Mastercycler ep gradient S</i>	30
Tab. 6:	PCR-Ansatz für VIM-PCR	31
Tab. 7:	VIM-PCR-Protokoll <i>Mastercycler</i> ® <i>pro</i>	31
Tab. 8:	Messung des DNA-Gehaltes	47
Tab. 9:	Ergebnisse der Sequenz-PCR nach VIM-PCR.....	50
Tab. 10:	Ergebnisse Checkerboard-Assay.....	56

10.3 Poster DGHM 2011

Auf der 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie vom 25.09.2011 bis 28.09.2011 wurde im Congress Center Essen, Deutschland das in Abbildung 60 dargestellte Poster vorgestellt. Hierfür sind Teile der in der Doktorarbeit beschriebenen Methoden und Ergebnisse aufgearbeitet worden.



5-nitro-8-hydroxyquinoline (nitroxoline): potential new application as carbapenemase inhibitor in the face of spreading "Superbugs"

A.C.S. Sobke, A.-S. Gunkel, S. Sachse, W. Pfister, E. Straube
Institute of Medical Microbiology, Medical University Laboratories, Friedrich-Schiller-University, Jena

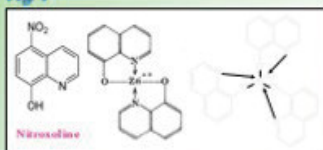
Introduction

While the preceding decade was marked by the efficient spread of *enterobacteriaceae* carrying the ESBL phenotype, we are now facing an alarming distribution of carbapenemase harbouring isolates referred to as „superbugs“ in the yellow press. These isolates are resistant to all beta-lactams with the exception of monolactams in some cases and - like ESBL - typically carry further resistance markers.

Only a few antimicrobials with poor effectivity-toxicity ratio are currently available as treatment options. Moreover, no new antibiotics will be introduced during the next decade - therefore alternative treatment strategies are immediately required.

Carbapenem hydrolysis is mediated either by a catalytically active serine residue (class A and D) or depends on zinc at the active centre (class B, metallo- β -lactamases: MBL). The ability to chelate di- and trivalent metal ions (Fig.1) is known to be the basis of NIT's antimicrobial activity, and as chelation of the essential zinc by EDTA is used during diagnostics of MBLs, we suspected that the oral antibiotic nitroxoline (NIT) might analogically block MBL function.

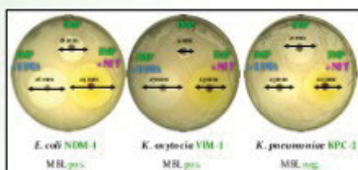
Fig. 1



Results

1. Comparison of NIT and EDTA in the mono-disk assay

Carbapenem hydrolysing β -lactamases belong to either Ambler class A, B or D. Of particular concern is the fast worldwide dissemination of KPC- (class A) and MBL- (class D) type enzymes. Chelators like EDTA act as inhibitors of MBL on the basis that this enzyme class requires zinc as essential cofactor for its activity. Fig.2 illustrates the result of a mono-disk screening assay employing 10 μ g imipenem disk \pm 750 μ g EDTA. A difference in inhibition zone size of \geq 7 mm is taken as positive. Comparable effects were achieved with NIT instead of EDTA.



2. Checkerboard assay

With the aid of the checkerboard dilution test we assessed the interaction of NIT and carbapenems. Imipenem was applied in serial twofold dilutions on the x-axis from 6.25 to 128 μ g/ml and NIT from 2 to 128 μ g/ml on the y-axis of a 96-well microtiter plate. The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated by the following formula, where X and Y correspond to the respective concentration at the growth-no-growth interface.

$$\text{FIC index} = \frac{\text{FIC}(\text{imipenem})}{\text{MIC}(\text{imipenem})} + \frac{\text{FIC}(\text{nitroxoline})}{\text{MIC}(\text{nitroxoline})}$$

$$= \frac{X(\text{imipenem})}{\text{MIC}(\text{imipenem})} + \frac{Y(\text{nitroxoline})}{\text{MIC}(\text{nitroxoline})}$$

The interpretation of the results was done on the basis of:

FIC index ≤ 0.5	defined as	Synergism
FIC index > 0.5 and ≤ 1.0	defined as	Additivity
FIC index > 1.0 and ≤ 2.0	defined as	Indifference
FIC index > 2.0	defined as	Antagonism

18 clinical isolates were examined, including 9 Ambler class B, 5 Ambler class A and 4 Ambler class D expressing strains (Tab.1). With the exception of UR 11710/10, all strains were kindly provided by Dr. Y. Pfeifer (RKI, Wernigerode). All assays were done in duplicate and according to CLSI recommendations.

Tab. 1

Strain	Genotype	Ambler class	FIC	Interaction
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5/08	VIM-1	B	0.5	Synergism
<i>Escherichia coli</i> 91/08	KPC-2	A	0.8	Additiv
<i>Enterobacter cloacae</i> 22/09	VIM-1	B	0.5	Synergism
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 40/08	VIM-4	B	0.5	Synergism
<i>Enterobacter cloacae</i> 12/08	VIM-1	B	0.5	Synergism
<i>Klebsiella oxytoca</i> 57/07	VIM-1	B	0.5	Synergism
<i>Enterobacter cloacae</i> 13/09	VIM-1	B	0.5	Synergism
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 46/09	IMP-16	B	0.8	Additiv
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 238/10	OXA-48	D	0.8	Additiv
<i>Enterobacter cloacae</i> 1/10	OXA-48	D	1.0	Additiv
<i>Escherichia coli</i> 2/10	NDM-1	B	0.5	Synergism
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 95/08	KPC-2	A	1.0	Additiv
<i>Klebsiella pneumoniae</i> UR11710/10	VIM-4	B	0.5	Synergism
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 16/10	OXA-48	D	0.8	Additiv
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 25/06	KPC-3	A	1.0	Additiv
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 12/10	KPC-3	A	0.8	Additiv
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11/10	KPC-3	A	1.25	Inaktiv-was
<i>Escherichia coli</i> 54/08	OXA-48	D	1.25	Inaktiv-was

3. Spectrophotometric measurement of imipenem degradation

Overnight cultures of the indicated strains were harvested by centrifugation. Thereafter we resuspended bacteria in PBS (intact cell suspension). Lysates were generated by sonication of the bacterial suspension with subsequent removal of insoluble cell debris by an additional centrifugation step. An appropriate amount of enzymatic activity was added to 1 ml PBS containing 150 μ M imipenem. The carbapenemase activity was followed by the loss of absorbance at 298 nm in a spectrophotometer fitted with a temperature-controlled cuvette holder at 37°C during a one hour incubation period.

Fig. 3A

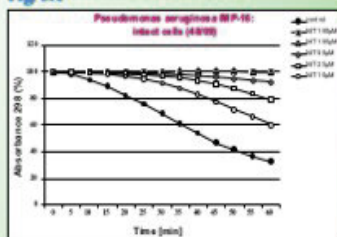
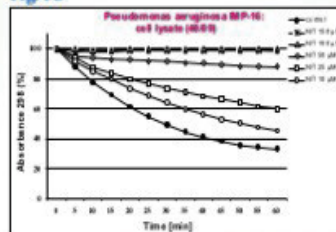


Fig. 3B



The enzymatic activity of class B carbapenemases was inhibited by NIT in a concentration dependent manner (Fig.3). This effect appeared even more pronounced in intact cell suspensions than in lysates, suggesting a potential accumulation of NIT in the cells. In all VIM and IMP containing lysates we tested, complete inhibition was achieved at 100-150 μ M NIT, independent of the bacterial species carrying the enzyme. In contrast, no effect on KPC enzyme activity (class A) was detected. By addition of 100 μ M Zn^{2+} in the incubation mixture the inhibition was completely resolved, whereas Ni^{2+} had only a minimal effect (Fig.4).

Fig. 4A

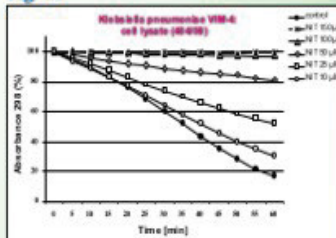
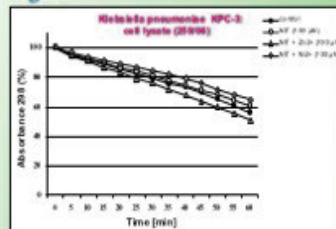


Fig. 4B



Conclusion

Nitroxoline had comparable effects to EDTA in the mono-disk assay. In checkerboard assays synergism was demonstrated for NIT and imipenem in strains harbouring class B enzymes, but not in strains expressing class A or D lactamases.

Hydrolysis of imipenem was inhibited by NIT in a concentration dependent manner, completely blocked by 100-150 μ M NIT in lysates of MBL, but not in class A containing cells. Inhibition could be overcome by addition of free zinc.

In summary we found NIT to be an effective inhibitor of class B carbapenemases by the chelation of zinc. It constitutes a promising candidate for the development of new therapeutic strategies.

10.4 Lebenslauf

ANNA-SOPHIA SONNEK

Wollestraße 23, 14482 Potsdam

0157 / 71436107

Anna-Sophia.Sonnek@t-online.de

Persönliche Daten

Geboren am:	16.02.1990 in Bad Langensalza, geb. Gunkel
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Berufserfahrung

seit November 2015	Facharztweiterbildung in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Klinikum Ernst von Bergmann gGmbH Potsdam
--------------------	---

Akademischer Werdegang

Oktober 2008 - Juni 2015	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Juni 2015	Studienabschluss mit Erhalt der Ärztlichen Approbation
April 2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2010	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2000 - Juni 2008	Salza Gymnasium in Herbsleben / Bad Langensalza, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Praktisches Jahr

Dezember 2014 - April 2015	3. Tertial in der Inneren Medizin im Katholischen Krankenhaus St. Johann Nepomuk Erfurt
----------------------------	---

September 2014 - Dezember 2014	2. Terial in der Chirurgie im Sophien- und Hufeland-Klinikum Weimar
Mai 2014 - September 2014	1. Terial in der Anästhesiologie und Intensivmedizin im Universitätsklinikum Jena

Famulaturen

September 2013	Institut für Rechtsmedizin im Universitätsklinikum Jena
September 2012	Gynäkologie und Geburtshilfe im St. Elisabeth-Krankenhaus Leipzig
März 2012	Allgemein- und Viszeralchirurgie im St. Elisabeth-Krankenhaus Leipzig
September 2011	Insitut für Medizinische Mikrobiologie im Universitätsklinikum Jena
August 2011	Notfallambulanz im Helios Klinikum Erfurt

Promotion

seit Oktober 2011	Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister, Institut für Medizinische Mikrobiologie im Universitätsklinikum Jena, <i>Thema: Nitroxolin als Inhibitor von Carbapenemasen der Metallo-β-Laktamase-Klasse</i>
-------------------	---

Praktische Erfahrungen

April 2013 - März 2014	Studentische Hilfskraft im Universitätsklinikum Jena
März 2013	fakultativer Sonographie-Grundkurs
Februar 2013	Unfallchirurgische Studentenwoche im Helios Klinikum Erfurt
März 2011 - April 2011	Lehrgang Tropenmedizin im Universitätsklinikum Jena

Zusatzqualifikationen

Fremdsprachen	Englisch – sehr gute Kenntnisse Französisch - Grundkenntnisse
EDV-Kenntnisse	Microsoft Office - gute Kenntnisse SAP, Orbis - gute Kenntnisse
Qualifikationen	Erwerb der erforderlichen Kenntnisse im Strahlenschutz für Ärzte im Juli 2013

Persönliche Interessen

Sport	Halbmarathon / Marathon Langstreckenwanderung
Akustikgitarre	
Gesellschaftstanz	Standard- und Lateinamerikanische Tänze

10.5 Danksagung

Für die Überlassung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Pfister aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena, der mir stets ein verständnisvoller Ansprechpartner war und durch seine konstruktive Kritik einen großen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit trägt.

Desweiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. med. A. Sobke für die Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit im Labor sowie bei der Anfertigung der Postervorstellung für die 63. Jahrestagung der DGHM 2011.

Dr. S. Sachse, Dr. K. Wolf und Dr. med. P. Keller danke ich recht herzlich für die freundliche Unterstützung in allen praktischen Belangen, bei denen sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die freundliche Unterstützung in sämtlichen Fragen zur Durchführung und Auswertung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Y. Pfeifer vom Robert Koch-Institut Wernigerode für die Bereitstellung eines Großteils der Carbapenemase produzierenden Bakterienstämme bedanken.

Meinen lieben Eltern und Schwestern danke ich von ganzem Herzen für ihren familiären Rückhalt, für ihre Kraft und Zeit sowie für die emotionale Unterstützung in jeder Lebenslage.

Ein besonderer Dank gilt meinem wunderbaren Ehemann Roman Sonnek, der in jeder Lebenslage zu mir hält und mich unterstützt. Er hat mir während der Anfertigung dieser Arbeit ganz besonderen Rückhalt gegeben, mich stets motiviert und mir den Rücken frei gehalten. Ohne ihn wäre diese Arbeit womöglich nie zu Ende gebracht worden.

10.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anna-Sophia Sonnek (geb. Gunkel), dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof.Dr.med. W.Pfister, Dr.med. A.Sobke,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Potsdam, 29.04.2016

Unterschrift des Verfassers